

THESE DE DOCTORAT
Spécialité : Génétique

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
Ecole doctorale COMPLEXITE DU VIVANT

**Caractérisation phénotypique
des anomalies de développement et d'homéostasie
du lignage mélanocytaire
de deux lignées de souris transgéniques**

Présentée par

M. Edouard REYES-GOMEZ

Soutenue publiquement le 12 juin 2014

Devant un jury composé de :

Mme Joëlle SOBCZAK-THEPOT	Présidente
Mme Corine BERTOLOTTO	Rapporteur
Mme Nadège BONDURAND	Rapporteur
Mme Sabine DRUILLENNEC-RODIERE	Examineur
M. André-Laurent PARODI	Examineur
Mme Geneviève AUBIN-HOUZELSTEIN	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

De nombreuses personnes méritent que je les remercie pour m'avoir aidé à mener à bien ce travail, tout au long de mes quatre années de thèse. Etablir une liste des remerciements est un exercice difficile, d'autant plus que cette liste peut avoir involontairement une allure hiérarchique. Chaque personne mentionnée ici a apporté sa pierre à l'édifice, d'une manière ou d'une autre, et je lui en suis pour cette raison très reconnaissant.

Je tenais tout d'abord à remercier profondément l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté et maintenu leur participation malgré les reports et les délais souvent courts que j'ai pu leur imposés, et pour avoir toujours fait preuve de compréhension, de disponibilité et de bienveillance à mon égard. Je remercie Mme Joëlle Sobczak-Thépot de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Je remercie Mme Corine Bertolotto et Mme Nadège Bondurand d'avoir accepté le rôle de rapporteur ; je leur suis reconnaissant des corrections rapides et des remarques qu'elles ont apportées à ce manuscrit. Je remercie Mme Sabine Druillennec-Rodière et M. André-Laurent Parodi d'avoir accepté le rôle d'examineurs dans ce jury.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Alain Eychene, Charles Durand et Florence Bernex, pour les discussions que nous avons eues et les conseils qu'ils m'ont prodigués.

Bien évidemment, je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse, Geneviève Aubin-Houzelstein qui m'aura accueilli pour la seconde fois dans son laboratoire et qui n'aura cessé de m'encadrer pendant ces quatre années, toujours avec douceur, gentillesse et sourire malgré les difficultés et les moments de doute. Au-delà des aspects scientifiques, ce fut une véritable expérience humaine qui nous a permis à chacun de mieux nous connaître. Geneviève, je n'ai pas de mots pour te témoigner ma gratitude et si je le pouvais, je crois que je préférerais l'exprimer avec des notes. Merci, merci, merci.

Je remercie tous les membres de l'UMR955, passés ou présents, que j'ai pu côtoyer tout au long de ce travail et qui ont toujours su trouver le temps de me soutenir, de m'aider ou de me conseiller : Audrey Casanova, Corine Koenen, Fanny Storck, Florence Bernex, Giorgia Egidy, Jacky Ezagal, Jean-Jacques Panthier, Laurent Guillaud, Laurent Tiret, Marie Abitbol, Patricia Bécret, Patricia Wiart, Philippe Bossé, Pierrick Salaün, Stéphanie Gadin, Sylvain Bellier, Vincent Gache, Yvette Colineaux. Qu'ils soient tous chaleureusement remerciés. En particulier, un grand merci, Stéphanie, pour m'avoir aidé dans mes travaux et pour la patience avec laquelle tu m'as enseigné les diverses techniques, toujours avec sourire et ce rire bien caractéristique ! Merci également à Pierrick, notre 4^{ème} colocataire, pour ton aide et tes petits moments de folie ! Merci à Giorgia qui m'a permis de travailler avec elle et Cécile sur le projet mélanome. Merci aux membres de la cocktail-team qui se reconnaîtront, et avec qui il est bon de décompresser ! Merci également à Johanna Djian et Nelly da Silva pour leur travaux qui ont servi de base à cette thèse.

Je remercie également tous les membres du laboratoire d'anatomie pathologique de l'ENVA, mon autre laboratoire, qui ont aussi toujours été présents pour me soutenir et qui m'ont aidé dans la réalisation de certains travaux : Agnès Champeix, Fara Rakotovo, Hélène Deré, Hélène Huet, Jean-Luc Servely, Narcisse Towanou, Patricia Wattier, Sandrine Oppici, Sophie Château-Joubert. Je remercie mes collègues enseignants-chercheurs, Eve Laloy, Jean-Jacques Fontaine et Nathalie Cordonnier, qui, en plus de leur soutien, ont toujours fait de leur mieux afin de me libérer du temps de recherche. J'espère à présent pouvoir leur rendre le même service, notamment pour ma chère Eve qui suit le même chemin.

Merci à mes directeurs de laboratoire, passés ou présents, Geneviève Aubin-Houzelstein, Laurent Tiret, Jean-Jacques Fontaine et Nathalie Cordonnier. Grâce à leur engagement et leur appui, ils m'ont permis de mener à bien mon projet, tant professionnellement que personnellement. Je leur suis profondément reconnaissant pour le temps qu'ils ont passé sur mon cas.

Je remercie aussi mes co-thésards, Cécile Campagne, Jordan Blondelle et Hélène Huet (bientôt la fin, Hélène) : nous avons partagé ensemble de très bons moments et, grâce à vous, je me suis senti moins seul dans ceux qui étaient plus difficiles. Cécile, merci ma poulotte pour m'avoir permis de travailler avec toi sur ton projet. Jordan, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi et de partager des moments aussi mémorables que ce voyage à Roscoff !

Je remercie Maxime Battistella pour les discussions très enrichissantes de pathologie comparée que nous avons eues. J'espère que nous aurons par la suite l'occasion de collaborer de nouveau ensemble.

Je remercie également Stéphane Blot du service de neurologie de l'ENVA pour le temps et la patience qu'il a consacrés aux électromyogrammes de nos petites souris.

Je remercie ma famille, et en particulier mes parents et ma sœur, Emilie, pour le soutien sans faille qu'ils m'ont apporté durant ces quatre années (ou devrais-je dire depuis maintenant près de 13 ans d'études interminables...). Sans vous, sans l'oxygène que vous m'apportez, je n'y serais pas parvenu. Avec tout mon amour.

Merci à Marie, la meilleure, pour son soutien depuis maintenant 25 ans ! La prochaine fois, ce sera donc ton tour ?

Merci à mes amis, qui ont toujours fait preuve de compréhension face à mes indisponibilités, et qui ont su se montrer patients. J'espère profiter maintenant pleinement de vous. Merci à Aude et Emmanuel, Caroline et Matthieu, Ingrid, Marine, Laëtitia et Fabien, Guillaume et Florent, Matthias et Anne-Claire, Marie et Anthony, Marie-Aude, Pierre-Olivier, Romain et Antoine, Sarah et Julien. Merci à Chloé, Aurélie et Laurent pour ces soirées gastronomiques qui remontent le moral (et le taux de cholestérol...). Merci à ces petits élèves, devenus maintenant grands vétérinaires et véritables amis : Caroline, Flora, Manon, Mathieu et Pierre.

TABLE DES MATIERES

Avant-propos.....	1
Introduction	3
I - Les mélanocytes : cellules pigmentaires de la peau	3
A - Le follicule pileux, un organe modèle pour l'étude des mélanocytes	3
1) Histologie topographique de la peau des mammifères.....	3
2) Histologie du follicule pileux.....	3
3) Cycle du follicule pileux.....	5
❖ Phase anagène	5
❖ Phase catagène.....	6
❖ Phase télogène	6
B - Le lignage mélanocytaire, des mélanoblastes aux mélanocytes	6
1) Les cellules du lignage.....	6
2) Les mélanocytes produisent des pigments de mélanine.....	8
❖ Le gène <i>tyrosinase</i>	9
❖ Les gènes <i>Tyrp1</i> et <i>Dct</i>	9
3) Le lignage mélanocytaire lors des phases du cycle pileux.....	10
II - Le développement du lignage mélanocytaire	13
A - Quelques définitions	13
B - Emergence du lignage mélanocytaire lors de l'embryogenèse	13
1) Les crêtes neurales et leurs dérivés.....	13
2) Dans la voie dorso-latérale, les mélanoblastes émergent directement des crêtes neurales.....	16
3) Dans la voie ventrale, les mélanoblastes émergent d'un précurseur commun avec le lignage glial	18
❖ Détermination du lignage glial	18
❖ Des mélanoblastes sont déterminés à partir des précurseurs de cellules de Schwann	20
C - Détermination du lignage mélanocytaire	21
1) Modèle hiérarchique de la détermination des CCN en mélanoblastes.....	21
2) Les CCN adoptent une voie de migration en fonction de leur détermination	22
D - <i>Mitf</i> , <i>Sox10</i> , <i>Pax3</i> , <i>Foxd3</i> : 4 gènes impliqués dans la détermination du lignage mélanocytaire...	23
1) <i>Mitf</i>	23
❖ Phénotype des mutants	23
❖ Structure.....	24
❖ Fonction.....	24
2) <i>Sox10</i>	26

❖ Phénotype des mutants	26
❖ Structure.....	26
❖ Fonction.....	27
3) <i>Pax3</i>	28
❖ Phénotype des mutants	28
❖ Structure.....	29
❖ Rôle.....	29
4) <i>Mitf</i> , <i>Sox10</i> et <i>Pax3</i> régulent la différenciation mélanocytaire	30
5) <i>Foxd3</i> réprime la destinée mélanocytaire	31
❖ Structure et fonction	31
E - Facteurs impliqués dans la détermination des mélanoblastes à partir des PCS.....	33
F - Plasticité des mélanocytes et des cellules de Schwann	34
III - Troubles de l'homeostasie du lignage mélanocytaire	36
A - Le mélanome : quand la prolifération des mélanocytes n'est plus contrôlée.....	36
1) Le mélanome cutané de l'homme : une maladie complexe et polymorphe.....	37
❖ Epidémiologie.....	37
❖ Caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des mélanomes cutanés.....	38
❖ Caractéristiques génétiques des mélanomes humains.....	40
2) Modèles animaux de mélanome	41
❖ Les mélanomes animaux sont différents des mélanomes humains	41
❖ Modèles murins de mélanomes : vers un modèle idéal ?	42
❖ La lignée de souris transgénique <i>Tyr::NRAS^{Q61K}</i> ; <i>Ink4a^{-/-}</i> comme modèle de mélanome métastatique.....	43
B - Le blanchiment du pelage : un défaut de maintien de la population de CSM.....	44
1) Les CSM résident dans le bulge	44
2) La mutation patchwork affecte les CSM	44
3) patchwork, une mutation difficilement classable	45
4) La voie Notch est indispensable au maintien d'une population de CSM	47
5) <i>Sbno2</i> , gène candidat pour la mutation patchwork, a une fonction mal connue	48
IV - Des maladies révèlent les liens entre mélanocytes et cellules de Schwann	50
A - Le schwannome mélanotique	50
B - La neurofibromatose de type 1.....	53
1) Taches café-au-lait.....	55
2) Lentigines de la région axillaire ou inguinale.....	55
3) Neurofibromes.....	56
4) Nodules de Lisch	58
5) NF1 et mélanome	58

6) Modèles murins de NF1	59
C - Le mélanome desmoplastique	60
Résultats.....	63
I - Développement d'un outil de visualisation du lignage mélanocytaire dans la peau.....	63
ARTICLE 1.....	65
II - Caractérisation phénotypique d'un modèle de mélanome : la lignée <i>Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}</i> ...	67
A - Proposition de classification des lésions mélanocytaires de la lignée <i>Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}</i>	67
ARTICLE 2.....	69
B - Utilisation de la lignée <i>Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}</i> pour étudier le rôle de PAX3 dans la progression du mélanome	71
C - Utilisation de la lignée <i>Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}</i> pour étudier le rôle de RACK1 dans la progression du mélanome	71
ARTICLE 3.....	73
ARTICLE 4.....	75
III - Caractérisation phénotypique de la lignée <i>Tg(Dct::Sbno2)</i>	77
A - Introduction	77
B - Résultats – Matériels et Méthodes.....	77
ARTICLE 5.....	79
C - Discussion.....	81
1) Validation de la lignée <i>Tg(Dct::Sbno2)</i>	81
❖ Phénotype de pelage des souris <i>Tg(Dct::Sbno2)</i>	83
❖ Expression de la β -galactosidase dans les structures nerveuses périphériques des souris C57BL/6J- <i>Tg(Dct::Sbno2)</i>	84
❖ Nature des cellules β -galactosidase positives dans les structures nerveuses périphériques des souris C57BL/6J- <i>Tg(Dct::Sbno2)</i>	85
❖ Lésions nerveuses et phénotype neurologique chez les souris C57BL/6J- <i>Tg(Dct::Sbno2)</i>	87
❖ Hypothèse de mode d'action de la surexpression de SBNO2 chez les souris C57BL/6J- <i>Tg(Dct::Sbno2) ; Tg(Dct::lacZ)</i>	87
Discussion générale et conclusion.....	91
Bibliographie	93

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Structure histologique du follicule pileux.....	4
Figure 2 : Cycle du follicule pileux chez la souris.....	5
Figure 3 : Ultrastructure des mélanosomes	7
Figure 4 : Schématisation des mélanocytes dans l'épiderme (homme)	7
Figure 5 : Mélanocytes dans la matrice du follicule pileux (souris)	7
Figure 6 : Etapes de la mélanogenèse	8
Figure 7 : Structure du gène <i>tyrosinase</i> et de sa protéine	9
Figure 8 : Structure des gènes TYRP1 et TYRP2 (DCT) et de leur protéine.....	10
Figure 9 : Embryons <i>Dct-LacZ</i> marqués par le X-Gal	10
Figure 10 : Renouvellement des mélanocytes de la matrice du follicule pileux à partir des CSM du <i>bulge</i>	11
Figure 11 : Stimulation de la mélanogenèse par le couple α MSH/MC1R.....	12
Figure 12 : Dérivés des CN.....	14
Figure 13 : Neurulation et formation des CN	15
Figure 14 : Voies de migration adoptées par les CCN	16
Figure 15 : Gènes exprimés par les cellules du lignage mélanocytaire chez la souris en fonction du temps	17
Figure 16 : Expression de gènes spécifiques du lignage mélanocytaire au cours du développement	17
Figure 17 : Cellules du lignage glial.....	18
Figure 18 : Structure histologique d'un nerf périphérique	19
Figure 19 : Protéines exprimées par les cellules du lignage glial au cours du développement.....	19
Figure 20 : Origine cellulaire et voies de migration du lignage mélanocytaire.....	21
Figure 21 : Modèle hiérarchique de la détermination progressive des mélanoblastes à partir des CN troncales.....	22
Figure 22 : Phénotype de souris mutantes pour le gène <i>Mitf</i>	24
Figure 23 : Structure de la protéine MITF chez la souris.....	24
Figure 24 : Phénotype d'une souris mutante hétérozygote au locus <i>Dominant Megacolon Sox10^{tm1Weg}/Sox10⁺ (Sox10^{lacZ})</i>	26
Figure 25 : Structure de la protéine SOX10.....	27
Figure 26 : Régulation de la différenciation mélanocytaire par SOX10	28
Figure 27 : Phénotype d'une souris hétérozygote pour la mutation <i>Splotch</i>	28
Figure 28 : Structure de la protéine PAX3	29
Figure 29 : Régulation de la différenciation mélanocytaire par PAX3	30
Figure 30 : Principales interactions entre <i>Mitf</i> , <i>Pax3</i> , <i>Sox10</i> , <i>Pax3</i> et les voies de signalisation impliquées dans la différenciation mélanocytaire.....	31
Figure 31 : Structure de FoxD3.....	32

Figure 32 : Interactions contrôlant le choix entre destinée gliale et destinée mélanocytaire : rôle central de <i>Mitf</i> et <i>Foxd3</i>	33
Figure 33 : Facteurs de transcription et facteurs solubles impliqués dans diversification des CCN	34
Figure 34 : Effets de l'endothéline 3 sur la plasticité des mélanocytes et des cellules gliales chez la caille	36
Figure 35 : Principaux types de mélanomes.....	39
Figure 36 : Caractéristiques histopathologiques d'un mélanome superficiel extensif humain	40
Figure 37 : Voies de signalisation impliquées dans le mélanome chez l'homme	41
Figure 38 : Souris <i>pwk/pwk</i>	45
Figure 39 : Exemples de mutants de couleur du pelage chez la souris	46
Figure 40 : La voie de signalisation Notch	47
Figure 41 : Comparaison de la séquence de la protéine sno chez la drosophile avec les séquences chez <i>Caenorhabditis elegans</i> , chez l'homme et chez la souris	48
Figure 42 : Coupe histologique d'un schwannome mélanotique chez un patient atteint d'un complexe de Carney.....	52
Figure 43 : Schwannome non mélanotique chez une souris <i>Prkar1a</i> ^{$\Delta 2/+$}	53
Figure 44 : Taches café-au-lait et lentigines de la région axillaires dans la neurofibromatose de type 1	55
Figure 45 : Neurofibromes dans la neurofibromatose de type 1	57
Figure 46 : Nodules de Lisch dans la neurofibromatose de type 1	58
Figure 47 : Neurofibromes plexiformes chez les souris <i>Plp1-creER Nf1</i> ^{<i>flox/flox</i>}	59
Figure 48 : Hyperpigmentation épidermique chez les souris <i>Dsk9</i>	60
Figure 49 : Caractéristiques histopathologiques du mélanome desmoplastique.....	61
Figure 50 : Expression de <i>Sbno2</i> révélée par hybridation <i>in situ</i>	82
Figure 51 : Types cellulaires dérivés des CN dans un nerf périphérique.....	86
Figure 52 : Modèle de développement des nerfs périphériques.....	86
Figure 53 : Spécification des neurones, cellules de Schwann et mélanocytes depuis les CCN troncales .	88
Figure 54 : Immunofluorescence anti-FOXD3 sur DRG d'embryons E12,5	88
Figure 55 : Hypothèses sur l'origine du phénotype des embryons transgéniques	89
Figure 56 : Test de l'effet <i>enhancer</i> de la mutation SBNO2 sur l'expression de <i>Sbno2</i> , <i>Dct</i> et <i>Foxd3</i>	90

LISTE DES ABREVIATIONS

BFABP : Brain Fatty Acid-Binding Protein

BMP : Bone Morphogenic Protein

CCN : Cellule de crêtes neurales

cM : centiMorgan

Cre : Recombinase Cre

CSM : Cellule souche de mélanocytes

Dct : *Dopachrome tautomérase*

Dct-lacZ : *Dopachrome tautomérase-lacZ*

DHI : 5,6-dihydroxyindole

DHICA : acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxilique

DHH : Desert Hedgehog

DRG : Ganglion rachidien ou spinal (Dorsal Root Ganglia)

EGF-like : Epidermal Growth Factor-like

eGFP : enhanced Green Fluorescent Protein

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

Edn3 : Endothéline 3

EDNRB : Endothelin receptor de l'endothéline de type B

Exx : xx^{ème} jour embryonnaire

Foxd3 : *Forkhead box d3*

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

Kb : kilobase

MC1R : Melanocortin 1 Receptor

Mitf : *Microphthalmia-associated Transcription Factor*

MSA : Migration Staging Area

NCSC : Cellules souches de crêtes neurales

NF1 : Neurofibromatose de type 1

NFM : Neurofilament-M

NRG1 : Neuroréguline 1

Pax3 : *Paired box gene 3*

PCS : Précurseurs de cellules de Schwann

PKA : Protéine Kinase A

PLP : Proteolipid Protein

pwk : *patchwork*

RACK1 : Receptor for Activated Kinase 1

RLD : Rhodamine-lysine dextran

Sbno2 : *Strawberry Notch homolog 2*

SCF : Stem Cell Factor (Kit ligand)

SCP : Précurseurs de cellules de Schwann

Sox10 : *SRY-box containing gene10*

STK11 : Serine/Threonine Kinase 11

TCAL : Tache café-au-lait

Tyr : Tyrosinase

TYRP1 : Tyrosinase-related protein 1 (= TRP1)

TYRP2 : Tyrosinase-related protein 2 (= DCT = Dopachrome tautomérase)

UV : Ultra-violets

YFP : Yellow Fluorescent Protein

ZEB2 : Zinc finger E-box Binding protein 2 = ZFH1B (Zinc Finger Homeobox 1b) = SIP (Smad Interacting Protein 1)

α -MSH : alpha-Melanocyte Stimulating Hormon (Mélanocortine)

AVANT-PROPOS

Chez les vertébrés, les mélanocytes sont des cellules spécialisées capable de produire un pigment appelé mélanine, responsable de la pigmentation de la peau et des phanères (poils, plumes). A ce titre, ils jouent un rôle protecteur vis-à-vis des rayons ultra-violet mutagènes, mais contribuent aussi à la diversité morphologique des espèces en autorisant d'innombrables combinaisons de couleurs et de motifs. Les mélanocytes participent également à d'autres fonctions comme l'audition (Motohashi *et al.*, 1994; Murillo-Cuesta *et al.*, 2010).

Bien que les fonctions exercées par les mélanocytes soient essentielles, elles ne sont pour autant pas indispensables à la vie. Cette particularité a permis d'étudier relativement facilement la biologie des mélanocytes. En effet, les mutations ciblant des gènes impliqués dans le développement des mélanocytes, qu'elles soient spontanées ou induites, engendrent généralement des individus viables au phénotype aisément repérable. A ce jour, il a ainsi été décrit chez la souris 378 loci contrôlant la couleur du pelage ; de ces 378 loci, seulement 171 gènes ont actuellement été clonés (<http://www.espcr.org/micemut/>). On peut classer ces gènes en deux groupes : ceux qui codent des protéines indispensables au développement des mélanocytes et ceux qui codent des protéines requises pour la fonction du mélanocyte. Plus récemment, un troisième groupe a été proposé pour des gènes dont les mutations sont associées à un phénotype de blanchiment prématuré du pelage (Osawa, 2009). Grâce à l'étude des nombreux mutants de couleur, il a ainsi été possible de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les processus de spécification, de détermination, de migration, de survie et de différenciation cellulaire non seulement pour le lignage mélanocytaire, mais aussi pour d'autres types cellulaires.

Ces avancées ont permis de mieux comprendre la biologie des mélanocytes mais aussi, grâce au développement de modèles animaux, d'éclairer la pathogénie des maladies affectant le lignage mélanocytaire avec, *in fine*, l'ouverture vers de nouvelles voies thérapeutiques. Ces maladies sont nombreuses et affectent aussi bien le développement, le fonctionnement que l'homéostasie des mélanocytes. On y trouve des affections bénignes (vitiligo, albinisme) mais également des affections tumorales dont la plus connue et la plus étudiée est le mélanome cutané. Parce que la souris est un modèle d'étude dont le génome est facilement manipulable, l'utilisation de souris transgéniques a permis d'une part de développer des modèles de maladies humaines comme le mélanome, d'autre part d'étudier la fonction d'un gène en analysant le phénotype associé à son invalidation ou à sa surexpression.

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à caractériser le phénotype de deux lignées de souris transgéniques présentant chacune une ou plusieurs anomalies en lien avec le développement ou l'homéostasie du lignage mélanocytaire. La première lignée (*Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}*) est un modèle de

mélanome humain. La seconde lignée (*Tg(Dct::Sbno2)*) a été développée dans notre laboratoire pour étudier la fonction du gène *Strawberry Notch homolog 2* (*Sbno2*) dans le lignage mélanocytaire.

Afin de mieux comprendre le phénotype de chaque lignée, nous présenterons dans une première partie introductive les caractéristiques du lignage mélanocytaire, en nous intéressant particulièrement aux étapes de son développement. Nous aborderons également les troubles de l'homéostasie affectant ce lignage. La lignée *Tg(Dct::Sbno2)* ayant montré un phénotype associant anomalies des mélanocytes et des nerfs, nous avons jugé intéressant de conclure cette partie introductive par une présentation de maladies soulignant le lien entre mélanocytes et cellules de Schwann.

INTRODUCTION

I - LES MELANOCYTES : CELLULES PIGMENTAIRES DE LA PEAU

Chez les mammifères, les mélanocytes sont présents principalement dans la peau (follicules pileux, épiderme, derme), l'œil (choroïde, iris) et la *stria vascularis* de l'oreille interne. Cette distribution connaît des variations interspécifiques. Chez les souris, par exemple, les mélanocytes cutanés sont presque exclusivement limités aux follicules pileux. Chez les souris de souche C57BL/6, il est par ailleurs fréquent d'observer des mélanocytes dans les valves cardiaques, la capsule splénique, les méninges, les glandes de Harder ou les glandes parathyroïdes. Ces localisations ectopiques sont communément appelées mélanoses (Percy et Barthold, 2007).

Dans ce manuscrit, nous limiterons notre étude aux mélanocytes cutanés, en insistant particulièrement sur les mélanocytes résidant dans les follicules pileux. Pour cette raison, nous proposons, avant de détailler les caractéristiques biologiques et morphologiques des mélanocytes, de faire ici un bref rappel de notions d'histologie et de physiologie du follicule pileux qui constitue un modèle d'étude du lignage mélanocytaire, et plus particulièrement des cellules souches de mélanocytes (Nishimura *et al.*, 2002).

A - Le follicule pileux, un organe modèle pour l'étude des mélanocytes

1) Histologie topographique de la peau des mammifères

La peau des mammifères est constituée de trois couches superposées, d'épaisseurs relative et absolue variables en fonction des espèces et des régions du corps. De la surface vers les plans profonds, on distingue ainsi l'épiderme, le derme et l'hypoderme. A cette structure de base, s'ajoutent des annexes : les follicules pileux, les muscles arrecteurs du poil, les glandes sébacées et les glandes sudoripares. L'épiderme forme un tissu épithélial constitué majoritairement de kératinocytes auxquels sont associés des mélanocytes, des cellules de Merkel et des cellules de Langerhans.

2) Histologie du follicule pileux

Les follicules pileux sont de longues structures dérivées de l'épiderme et invaginées dans le derme. Ils sont chargés de la production des poils ou tiges pilaires (Figure 1). Ils s'étendent depuis l'ostium folliculaire d'où sort le poil, jusque dans le derme profond, voire l'hypoderme, où ils se terminent par un renflement, le bulbe. Les glandes sébacées forment de petites grappes accolées aux follicules pileux auxquels elles sont reliées par un canal excréteur. Un follicule pileux et la glande

sébacée associée forment une unité fonctionnelle appelée unité pilo-sébacée. Plus profondément, s'insère le muscle arrecteur du poil (ou muscle horripilateur).

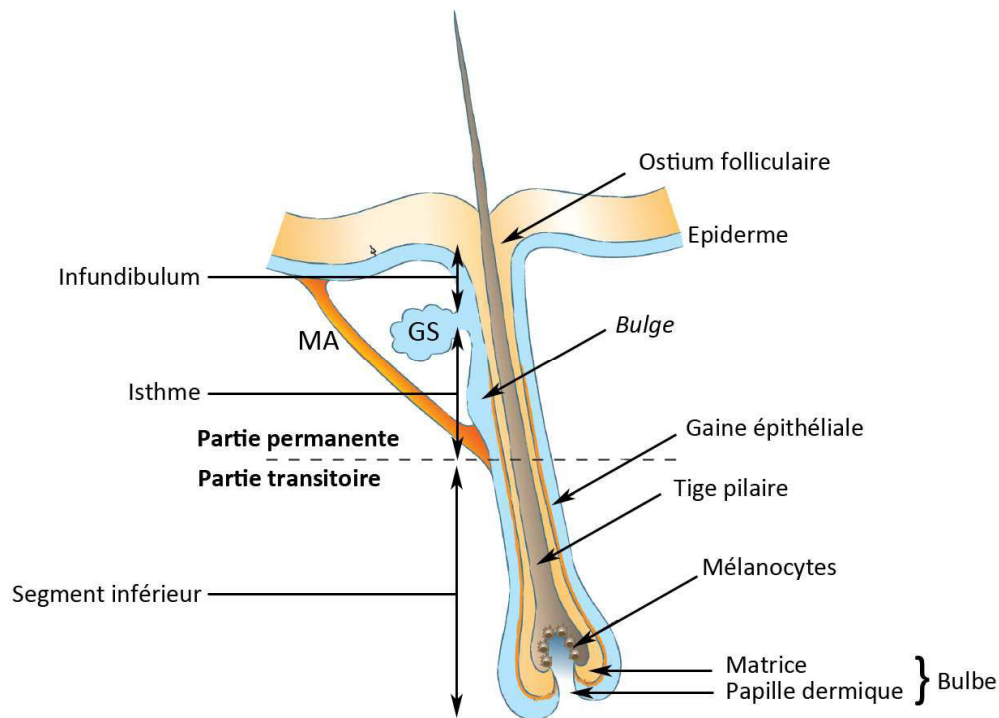


Figure 1 : Structure histologique du follicule pileux

MA : Muscle arrecteur du poil ; **GS** : Glande sébacée. (d'après Schouwey et Beermann, 2008)

Les points d'insertion des glandes sébacées et du muscle arrecteur permettent de définir les trois régions du follicule pileux (Figure 1) : 1) l'infundibulum, partie superficielle, s'étend depuis l'ostium folliculaire jusqu'au point d'insertion des glandes sébacées ; 2) l'isthme, partie moyenne, se situe entre l'insertion des glandes sébacées et l'insertion du muscle arrecteur du poil ; 3) le segment inférieur s'étend de l'insertion du muscle arrecteur du poil au bulbe. Infundibulum et isthme forment la partie permanente du follicule pileux alors que le segment inférieur en est la partie transitoire.

Les follicules pileux sont constitués d'une gaine épithéliale (ou gaine radulaire épithéliale) qui entoure la tige pileire en formation et dont la structure varie en fonction des régions du follicule pileux (infundibulum, isthme et segment inférieur). Le bulbe, qui forme l'extrémité du follicule pileux, correspond à l'association d'une matrice, d'origine épidermique, et d'une papille dermique, d'origine conjonctive. Cette dernière, riche en vaisseaux et en nerfs, assure la nutrition et l'innervation de la matrice dont elle n'est séparée, lorsque le bulbe est présent, que par une lame basale. Ce sont les cellules matricielles, qui après multiplication et différenciation, sont à l'origine de la tige pileire et d'une partie de la gaine épithéliale (Rogers, 2004).

Le *bulge* est un renflement de la partie externe de la gaine épithéliale, situé au point d'insertion du muscle arrecteur du poil. Le *bulge* contient les cellules à l'origine de la reconstruction d'un nouveau follicule pileux (Cotsarelis *et al.*, 1989) : il constitue la niche des cellules souches des kératinocytes et

des cellules souches des mélanocytes (CSM) (Nishimura *et al.*, 2002; Oshima *et al.*, 2001). Bien visible chez la souris, le *bulge* est plus difficile à identifier dans les follicules pileux de l'homme et du chien (Kobayashi *et al.*, 2010; Ohyama *et al.*, 2006).

3) Cycle du follicule pileux

Le follicule pileux connaît un développement cyclique caractérisé par une phase de croissance (anagène), une phase d'involution (catagène) et une phase de repos (télogène) (Figure 2). Au cours de ce cycle, seule la partie profonde du follicule pileux subit des phases de croissance et de régression (Chase, 1954; Paus et Cotsarelis, 1999; Stenn et Paus, 2001; Sundberg *et al.*, 2005). La durée de chaque phase dépend, entre autres, de l'âge, des régions du corps, de la race, du sexe, de l'espèce et peut être influencée par l'exposition lumineuse, la température ambiante, l'alimentation, les hormones, l'état de santé etc. Chez une jeune souris, un cycle complet dure environ un mois (Müller-Röver *et al.*, 2001). Chez les souris âgées, la phase télogène est plus longue, si bien qu'un cycle peut durer plusieurs mois (Chase, 1954). La morphologie du follicule pileux est différente et caractéristique pour chacune des trois phases du cycle du poil.

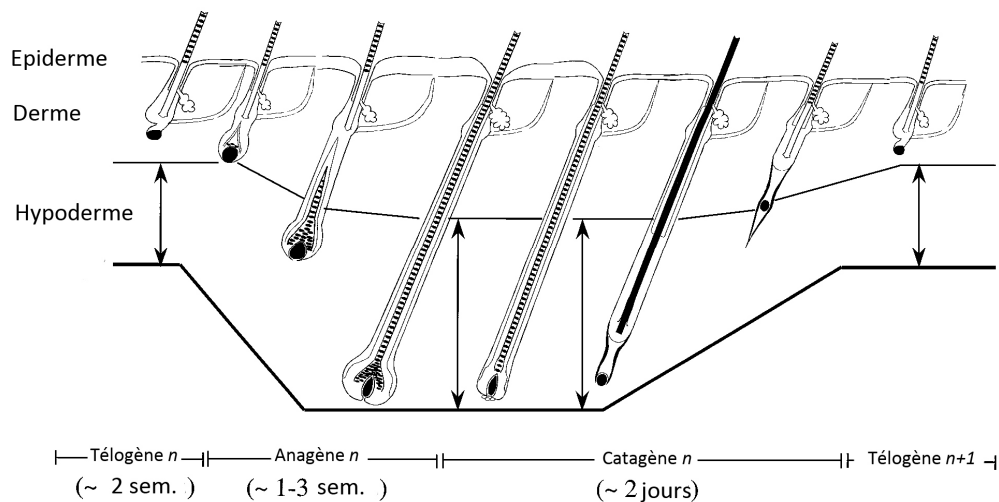


Figure 2 : Cycle du follicule pileux chez la souris

Les durées respectives de chaque phase du cycle sont indiquées (d'après Müller-Röver *et al.*, 2001).

❖ Phase anagène

La phase anagène est subdivisée en six stades (de I à VI). Un follicule en phase anagène se reconnaît à son bulbe bien développé et profond qui atteint l'hypoderme. La matrice recouvre complètement la papille dermique et comporte de nombreuses cellules en division (nombreuses images de mitoses) (Lavker *et al.*, 2003; Müller-Röver *et al.*, 2001).

❖ Phase catagène

Elle se caractérise par la remontée du bulbe et son atrophie progressive. Des cellules en apoptose sont visibles dans la gaine épithéliale et la matrice (Lindner *et al.*, 1997).

❖ Phase télogène

Pendant la phase télogène, le follicule pileux est au repos et atteint sa taille minimale dans le derme correspondant à sa partie permanente. A la base du follicule pileux, la matrice du bulbe est réduite à une petite population cellulaire compactée, en contact avec la papille dermique. La papille dermique est elle-même réduite à un petit amas sphérique de cellules fibroblastiques.

A la fin de la phase télogène et au début de la phase anagène du cycle suivant, des signaux se mettent en place afin de produire un nouveau poil. Des cellules souches quiescentes localisées près de la papille dermique sont activées pour produire une nouvelle tige pileuse (Blanpain *et al.*, 2004; Tumber *et al.*, 2004). Le nouveau poil en croissance pousse l'ancien qui finit par tomber en fin d'anagène IV (Müller-Röver *et al.*, 2001). Les signaux permettent une coordination entre la prolifération, la migration et la différenciation des cellules à l'origine des différentes couches cellulaires qui constituent le follicule pileux. Les cellules souches contenues dans le *bulge* donnent naissance à des cellules à fort index mitotique et qui constituent les futures cellules matricielles.

B - Le lignage mélanocytaire, des mélanoblastes aux mélanocytes

1) Les cellules du lignage

Les **mélanocytes** sont des cellules dérivées des crêtes neurales (CN) capables de synthétiser des pigments de mélanine au cours d'un processus appelé **mélanogenèse**. Cette synthèse a lieu exclusivement dans des organites dotés d'une activité tyrosinase et spécifiques au lignage mélanocytaire : les **mélanosomes**. Ces lysosomes modifiés présentent quatre stades de maturation (de I à IV) dont les critères de différenciation ultrastructuraux sont principalement la forme et l'intensité de dépôts de mélanine de la matrice (Figure 3) (Orlow, 1995; Raposo et Marks, 2007).

Un mélanocyte complètement différencié est ainsi caractérisé par une activité tyrosinase, la présence de mélanosomes matures (stades III et IV) et une forme dendritique (Hirobe, 1995). La distribution des mélanocytes dans la peau n'est pas la même chez tous les mammifères. Alors que chez l'homme les mélanocytes sont localisés dans la couche basale de l'épiderme (Figure 4), chez d'autres mammifères, comme la souris, les mélanocytes sont présents presque exclusivement dans le bulbe des follicules pileux (Figure 5) (Cichorek *et al.*, 2013; Ha *et al.*, 2005; Percy et Barthold, 2007).

Les **mélanoblastes** sont les précurseurs de mélanocytes. Ces cellules issues des CN ont une haute capacité proliférative. De la multipotence initiale des cellules de crêtes neurales (CCN), elles n'ont

conservé que la potentialité mélanocytaire. S'agissant de cellules immatures, elles ne possèdent que des mélanosomes de stade I et II (Sviderskaya *et al.*, 1995).

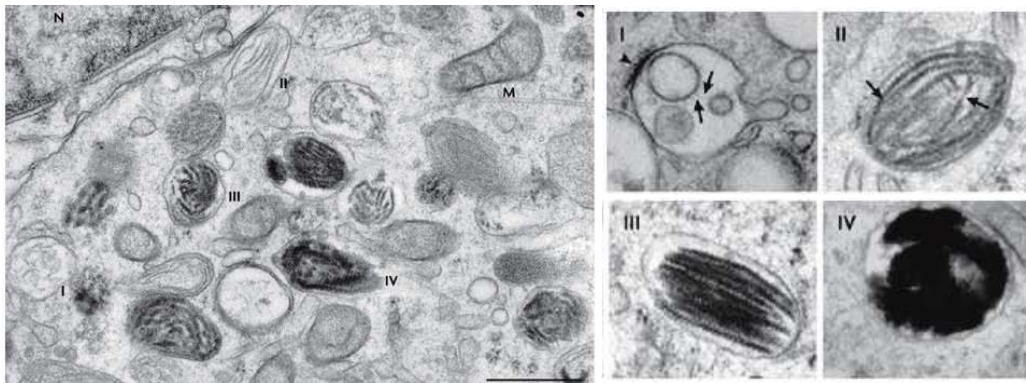


Figure 3 : Ultrastructure des mélanosomes

Haut (Gauche à droite) : Morphologie des mélanosomes de stade I à IV en microscopie électronique à transmission. **Bas :** Mélanosomes de stade I à IV dans le cytoplasme d'un mélanocyte de mélanome (lignée MNT-1). N : Noyau ; M : Mitochondrie. Barre = 0.5 µm (d'après Raposo et Marks, 2007).

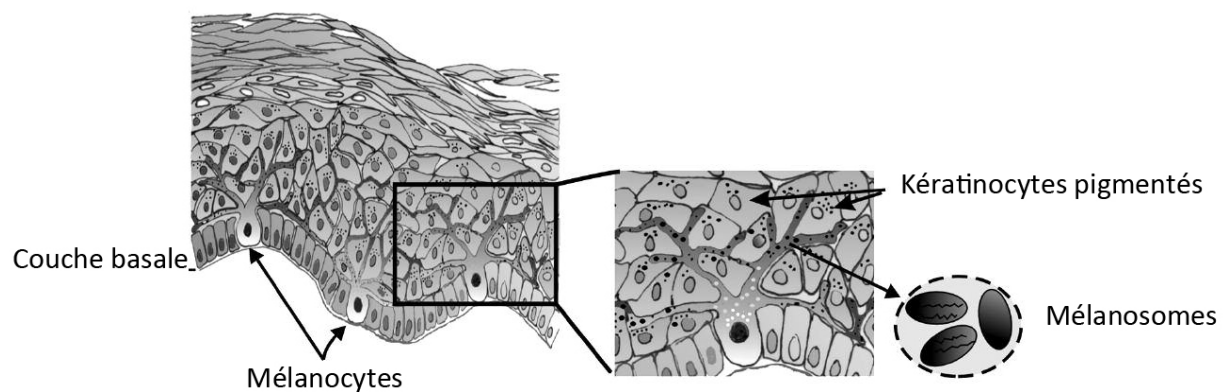


Figure 4 : Schématisation des mélanocytes dans l'épiderme (homme)

Chez l'homme, les mélanocytes sont localisés dans la couche basale de l'épiderme. Ils projettent leurs dendrites autour des kératinocytes voisins à qui ils transmettent les mélanosomes (d'après Cichorek *et al.*, 2013).

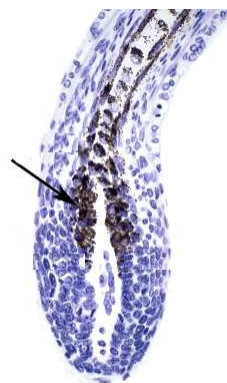


Figure 5 : Mélanocytes dans la matrice du follicule pileux (souris)

Coupe histologique de la partie inférieure d'un follicule pileux colorée à l'hématoxyline. La flèche indique des mélanocytes dont on distingue les pigments noirs de mélanine (adapté de <http://eulep.pdn.cam.ac.uk/~skinbase/index.php>).

Les **cellules souches de mélanocytes (CSM)** sont des cellules quiescentes localisées dans la niche constituée par le *bulge* du follicule pileux. Elles constituent une source de mélanocytes pour assurer la pigmentation du poil au fur et à mesure des cycles pilaires (Nishimura *et al.*, 2002).

2) Les mélanocytes produisent des pigments de mélanine

Dans le follicule pileux, la mélanogenèse n'a lieu qu'au cours des phases anagène II à VI dans les mélanocytes de la matrice (Chase, 1954). Elle s'interrompt dès le début du catagène pour ne reprendre qu'au début du cycle pilaire suivant (Slominski *et al.*, 1994). La mélanogenèse aboutit à la synthèse, à partir de l'acide aminé tyrosine, de deux types de mélanines : les eumélanines (brunes à noires) et les phaéomélanines (jaunes-orangées). Les eumélanines sont le principal rempart contre les rayons ultra-violet (UV) chez les individus à peau fortement pigmentée. Trois enzymes interviennent dans la synthèse des mélanines : la **tyrosinase (TYR)** ; la **Tyrosine related protein 1 (TYRP1)** ; la **Dopachrome tautomérase (DCT)** ou Tyrosine related protein 2 (TYRP2). Les trois gènes qui codent ces enzymes (*Tyr*, *Tyrp1* et *Dct*) sont des marqueurs du lignage mélanocytaire. Dans cette synthèse, la tyrosinase est l'enzyme clé car elle permet notamment l'hydroxylation de la tyrosine, ce qui constitue l'étape limitante de la mélanogenèse (Figure 6).

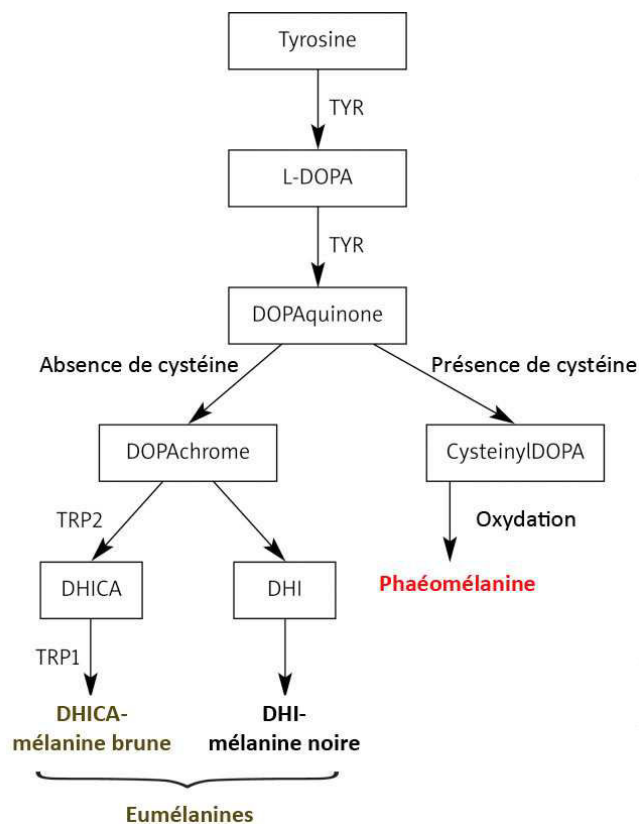


Figure 6 : Etapes de la mélanogenèse

La synthèse de la mélanine se fait à partir de la tyrosine. TRP1 = TYRP1 ; TRP2 = DCT (d'après Cichorek *et al.*, 2013)

❖ Le gène *tyrosinase*

Le gène *tyrosinase* (*Tyr*) est situé, chez la souris, sur le chromosome 7 au locus *albinos*. Ce gène est constitué de 5 exons et 4 introns et possède une séquence codante de plus de 70 kilobases (kb) (Figure 7). Le gène *tyrosinase* code la tyrosinase. Cette enzyme possède un peptide signal, deux régions riches en cystéines et une région transmembranaire permettant son intégration dans les mélanosomes (del Marmol et Beermann, 1996). Parmi les mutations dans le gène *tyrosinase*, la mutation *albinos* (*Tyr^c*) est la plus connue. Le phénotype des souris homozygotes pour cette mutation est caractérisé par un pelage blanc et des yeux rouges, conséquences d'une absence de production de mélanine. La couleur rouge des yeux correspond à la couleur naturelle de l'iris, très vascularisé, qui n'est alors plus masquée par la mélanine. Chez l'homme, plusieurs formes d'albinisme sont décrites. Ces maladies ségrégent selon un mode autosomique récessif. Les mutations dans le gène de la tyrosinase sont responsables de l'albinisme oculocutané de type I (Montoliu *et al.*, 2014).

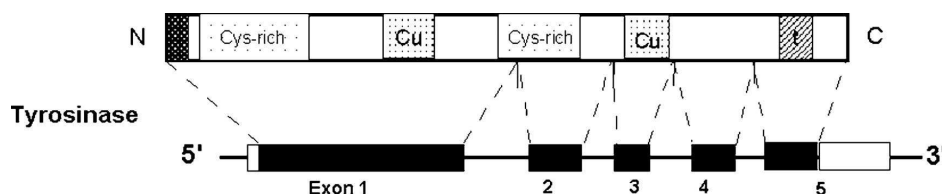


Figure 7 : Structure du gène *tyrosinase* et de sa protéine

N et C désignent les extrémités N-terminale et C-terminale respectivement. **Cys-rich** = segments riches en cystéine ; **Cu/Me** = domaine capable de se lier au cuivre ou à un métal ; **t** = segment transmembranaire (Slominski *et al.*, 2004).

❖ Les gènes *Tyrp1* et *Dct*

Chez la souris, *Tyrp1* (ou *TRP1*) et *Dct* (ou *Tyrp2*) sont deux gènes localisés respectivement au locus *brown* (chromosome 14) et au locus *slaty* (chromosome 14). Ils codent deux protéines spécifiques du mélanosome, présentant une grande homologie de séquence avec la tyrosinase et, pour cette raison, nommées TYRP1 et TYRP2, pour TYROSinase-Related Proteins (Jackson, 1988; Jackson *et al.*, 1992; Kwon *et al.*, 1987; Shibahara *et al.*, 1986)(Figure 8).

TYRP2 est également appelée Dopachrome tautomérase (DCT) car cette enzyme catalyse l'isomérisation de DOPAchrome en DHICA (acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxilique) qui, sinon, se transforme spontanément en DHI (5,6-dihydroxyindole). Le gène *Dct*, exprimé dans les mélanoblastes dès le 10^{ème} jour ½ de l'embryogenèse (E10,5) chez la souris, est utilisé comme marqueur du lignage mélanocytaire, aussi bien lors du développement embryonnaire que chez l'adulte (Figure 9) (Mackenzie *et al.*, 1997; Pavan et Tilghman, 1994; Steel *et al.*, 1992). Bien qu'il soit exprimé très précocement, l'inactivation de *Dct* ne donne pas de phénotype embryonnaire et n'entraîne chez l'adulte qu'une légère dilution du pelage (Guyonneau *et al.*, 2004).

TYRP1 est caractérisée par une forte activité DHICA oxydase qui lui est spécifique et lui permet d'oxyder le DHICA en carboxyl-indole quinone (Kobayashi *et al.*, 1994). Notons que TYRP1 possède également une faible activité dopachrome tautomérase (Winder *et al.*, 1993).

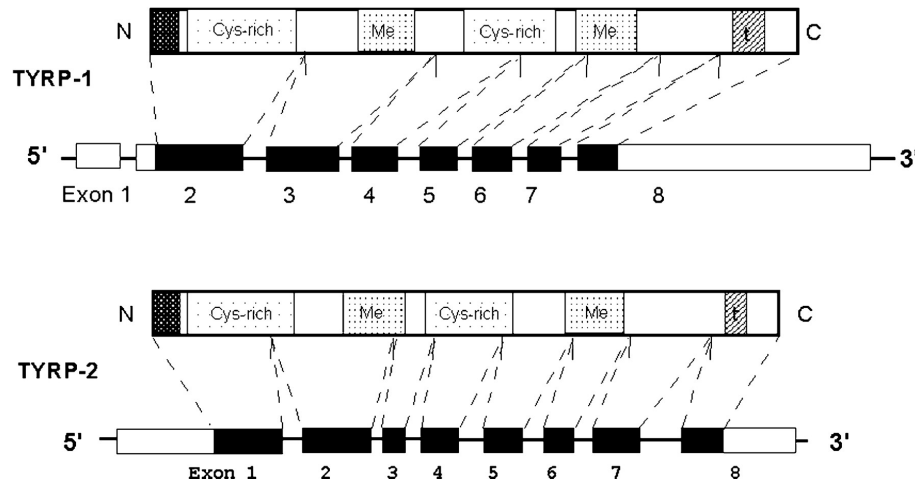


Figure 8 : Structure des gènes TYRP1 et TYRP2 (DCT) et de leur protéine

N et C désignent les extrémités N-terminale et C-terminale respectivement. **Cys-rich** = segments riches en cystéine ; **Cu/Me** = domaine capable de se lier au cuivre ou à un métal ; **t** = segment transmembranaire. (Slominski *et al.*, 2004)

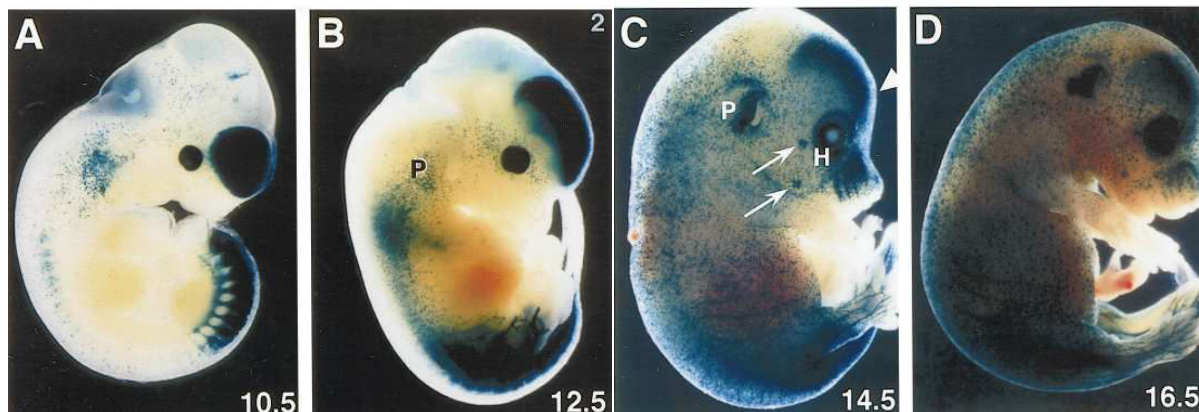


Figure 9 : Embryons *Dct-LacZ* marqués par le X-Gal

Le transgène *Dct-LacZ* permet l'expression du gène rapporteur *LacZ* codant la β -galactosidase sous contrôle du promoteur de *Dct*. Après traitement par le X-gal, substrat de la β -galactosidase, on obtient un marquage bleu correspond aux cellules exprimant *Dct*, c'est-à-dire au lignage mélanocytaire. **A** : Embryon à E10,5 ; **B** : Embryon à E12,5 ; **C** : Embryon à E14,5 ; **D** : Embryon à E16,5. P : Oreille externe ; H : Glande de Harder (d'après Mackenzie *et al.*, 1997).

3) Le lignage mélanocytaire lors des phases du cycle pileaire

Lors du premier cycle pileaire, la pigmentation du poil est assurée par les mélanoblastes épidermiques ayant colonisé le follicule pileux pendant l'embryogenèse. Ceux-ci migrent, tout en

proliférant, dans la partie externe de la gaine épithéliale pour rejoindre le bulbe dont ils atteignent la matrice pour finalement se différencier en mélanocytes pigmentés (Mak *et al.*, 2006). Tous les mélanoblastes n'atteignent cependant pas la matrice. En effet, certains s'arrêtent pour coloniser le *bulge* où ils constitueront une population de CSM pour les cycles suivants (Mak *et al.*, 2006; Nishimura *et al.*, 2002). Ces CSM, maintenues dans un état indifférencié, se multiplient peu, sont douées d'auto-renouvellement et sont capables de produire un grand nombre de mélanocytes pigmentés (Nishimura *et al.*, 2002).

A partir du stade anagène II des cycles suivants, les CSM s'activent et prolifèrent alors que leur noyau augmente de taille (Nishimura *et al.*, 2002). Leur division se produit de façon asymétrique et fournit ainsi d'une part une cellule souche fille permettant d'assurer l'auto-renouvellement, d'autre part un progéniteur de mélanocytes dénommé *Transient Amplifying Melanoblast* (TAM). Les TAM quittent le microenvironnement des cellules souches, appelé niche, pour migrer, tout en se multipliant, dans la partie externe de la gaine épithéliale et enfin rejoindre la matrice du bulbe où ils se multiplieront et se différencieront en mélanocytes pigmentés (Figure 10) (Nishimura *et al.*, 2002).

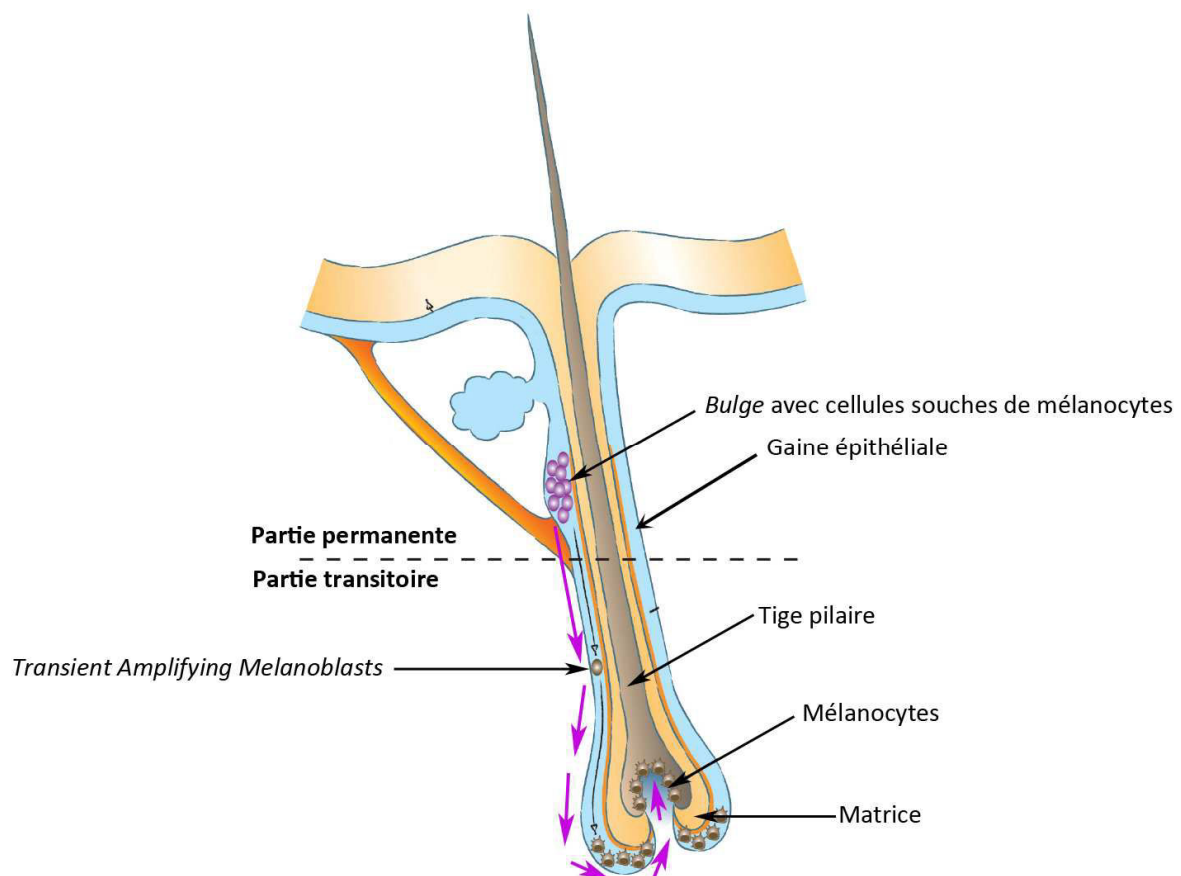


Figure 10 : Renouvellement des mélanocytes de la matrice du follicule pileux à partir des CSM du *bulge*

Les cellules souches de kératinocytes et les CSM sont localisées dans le *bulge*. Lors de l'anagène, les CSM débutent leur différenciation tout en proliférant et en migrant dans la gaine épithéliale du follicule pileux, depuis le *bulge* vers la matrice. Les progéniteurs de mélanocytes ou *Transient Amplifying Melanoblasts* achèvent leur différenciation en mélanocytes dans la matrice (d'après Schouwey et Beermann, 2008).

Lors du catagène, on observe un retour à l'état quiescent des CSM du *bulge* qui redeviennent petites et rondes (Nishimura *et al.*, 2002). Parallèlement, les mélanocytes du bulbe meurent par apoptose (Lindner *et al.*, 1997; Tobin *et al.*, 1998). Au stade télogène, les rares cellules du lignage mélanocytaire qui persistent sont non pigmentées et correspondent aux CSM quiescentes dans le *bulge* (Nishimura *et al.*, 2002; Silver *et al.*, 1976; Slominski *et al.*, 1994; Sugiyama, 1979).

L'activité et la prolifération des mélanocytes dans l'épiderme est en partie contrôlée par les kératinocytes voisins *via* des facteurs de croissances ou des molécules d'adhésions (Haass et Herlyn, 2005; Lee, 2012). Les kératinocytes produisent par ailleurs des hormones qui participent à la régulation de la prolifération des mélanocytes, à la mélanogénèse et à la formation des dendrites des mélanocytes (Sulaimon et Kitchell, 2003). Citons par exemple la α -MSH (Melanocyte-Stimulating Hormon), produite par les kératinocytes, qui après liaison à son récepteur à la surface des mélanocytes, le MC1R (Melanocortin 1 Receptor), stimule la mélanogénèse, la formation de dendrites et le transfert des mélanosomes (Slominski *et al.*, 2004)(Figure 11).

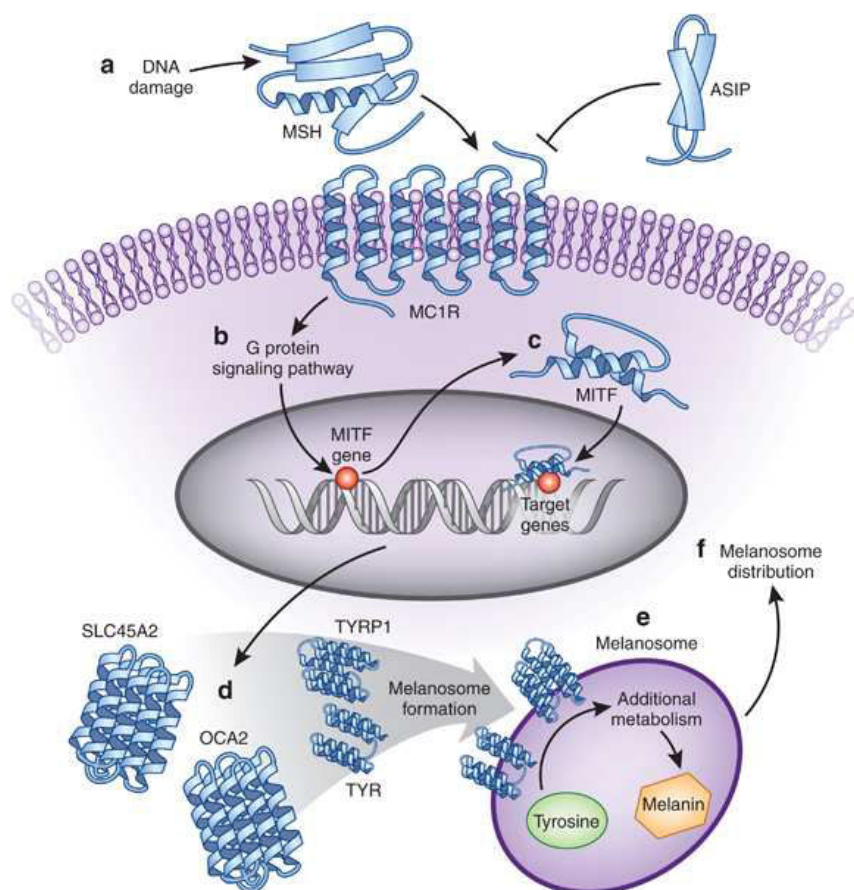


Figure 11 : Stimulation de la mélanogénèse par le couple α MSH/MC1R

La voie de l' α -MSH peut être stimulée par des dommages de l'ADN induits par les ultra-violets (a). L' α -MSH active son récepteur membranaire à la surface des mélanocytes, le MC1-R. Cette activation peut être inhibée par la *agouti signalling protein* (ASIP). L'activation de MC1R induit l'expression de *MITF* *via* une voie dépendante des protéines G (b). MITF induit la transcription de gènes impliqués dans la mélanogénèse. *SLC45A2* (*solute carrier family 45 member 2*) et *OCA2* (*oculocutaneous albinism type 2*) codent des protéines impliquées dans l'adressage des protéines de la mélanogénèse, comme TYR et TYRP1, vers les mélanosomes (d). La mélanine est par la suite produite à partir de la tyrosine (e) dans les mélanosomes, ensuite distribués aux kératinocytes voisins (f). (d'après Law *et al.*, 2012)

II - LE DEVELOPPEMENT DU LIGNAGE MELANOCYTAIRE

A - Quelques définitions

Tout au long de l'embryogenèse, le développement des organes et tissus se produit à partir de cellules embryonnaires immatures qui progressivement acquièrent les caractéristiques des cellules matures adultes. Ce processus se fait en plusieurs étapes.

La **différenciation** est la spécialisation d'une cellule. Elle correspond à l'acquisition de particularités morphologiques et fonctionnelles (Gilbert, 2000). Pour les mélanocytes, la différenciation se traduit entre autres par la forme dendritique et le développement de mélanosomes matures. La différenciation est précédée par un **engagement** (*commitment*) de la cellule vers une destinée particulière. Une cellule peut être engagée sans pour autant être distinguable phénotypiquement des autres cellules non-engagées (Gilbert, 2000). Le processus d'engagement peut être divisé en deux étapes. La première de ces étapes est appelée **spécification**. On considère qu'une cellule (ou un tissu) est spécifiée si elle est capable de se différencier de manière autonome lorsqu'elle est mise en culture dans un milieu neutre. A ce stade, l'engagement est considéré comme réversible (Gilbert, 2000). La seconde étape de l'engagement est la **détermination**. Une cellule (ou un tissu) est dite déterminée si elle est capable de se différencier de manière autonome même lorsqu'elle est placée dans une autre région de l'embryon. Puisque la cellule est, dans ces conditions, encore capable de suivre sa destinée, l'engagement est à ce stade considéré comme irréversible (Gilbert, 2000).

Ces définitions ne reflètent pas la plasticité qui peut être observée dans certaines conditions expérimentales, où des cellules différenciées en un type cellulaire peuvent être amenées à se différencier en un autre type cellulaire.

La détermination implique un changement stable dans l'état interne de la cellule, conséquence d'une modification du profil d'expression de ses gènes. Pour cette raison, l'étude des mutants de couleur a joué un rôle déterminant dans l'identification des gènes impliqués dans la détermination des cellules de crêtes neurales en mélanoblastes.

B - Emergence du lignage mélanocytaire lors de l'embryogenèse

1) Les crêtes neurales et leurs dérivés

Embryologiquement, les mélanocytes dérivent des CN. Décrites pour la première fois en 1838 par Wilhelm His, ces structures transitoires d'origine neuroectodermique, spécifiques aux embryons de Vertébrés, se forment le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon, de part et d'autre du futur système nerveux central (tube neural). Les cellules de crêtes neurales (CCN) ont des propriétés de cellules souches, c'est-à-dire qu'elles se divisent rarement, sont dotées d'une capacité d'auto-renouvellement, qu'elles peuvent par division asymétrique donner une nouvelle cellule souche et un

progéniteur, et qu'elles sont multipotentes (Morrison et Spradling, 2008; Simões-Costa et Bronner, 2013).

En plus des mélanocytes, les CN sont à l'origine de types cellulaires de natures très diverses (tissu nerveux, épithéliums, tissus conjonctifs, muscles) répartis dans de nombreux organes (chaîne nerveuse orthosympathique, nerfs périphériques, cœur, œil, peau, tube digestif) (Simões-Costa et Bronner, 2013) (Figure 12). Citons notamment les cellules de Schwann des nerfs, les cellules de la médullo-surrénale, les cellules des muscles et des os de la face ainsi que le stroma cornéen.

Chaque segment de CN ne fournit pas les mêmes dérivés et la destinée des CCN dépend notamment de leur position le long de l'axe antéro-postérieur (Le Douarin *et al.*, 2008; Lwigale *et al.*, 2004; Santagati et Rijli, 2003)(Figure 12). Bien qu'elles soient ainsi restreintes dans le choix de leur destinée, des expériences de transplantation et de cultures montrent cependant qu'elles ont initialement le même potentiel et que leur destinée est donc influencée par leur environnement (Le Douarin et Dupin, 2003).

La formation des CN débute chez l'embryon de poulet entre le premier et le deuxième jour de développement, chez la souris entre le huitième et le neuvième jour embryonnaire (E8 et E9), et chez l'homme au cours de la troisième semaine de gestation (Figure 13). L'induction des CN fait suite aux signaux Bone Morphogenic Protein (BMP) et Wnt en provenance du tube neural dorsal et de l'ectoderme recouvrant le tube neural (García-Castro *et al.*, 2002). Il en résulte une expression de facteurs de transcriptions propres aux CCN, tels que SLUG/SNAIL, les SoxE, PAX3 et FOXD3 (del Barrio et Nieto, 2002; Dutton *et al.*, 2001; Epstein *et al.*, 1991b).

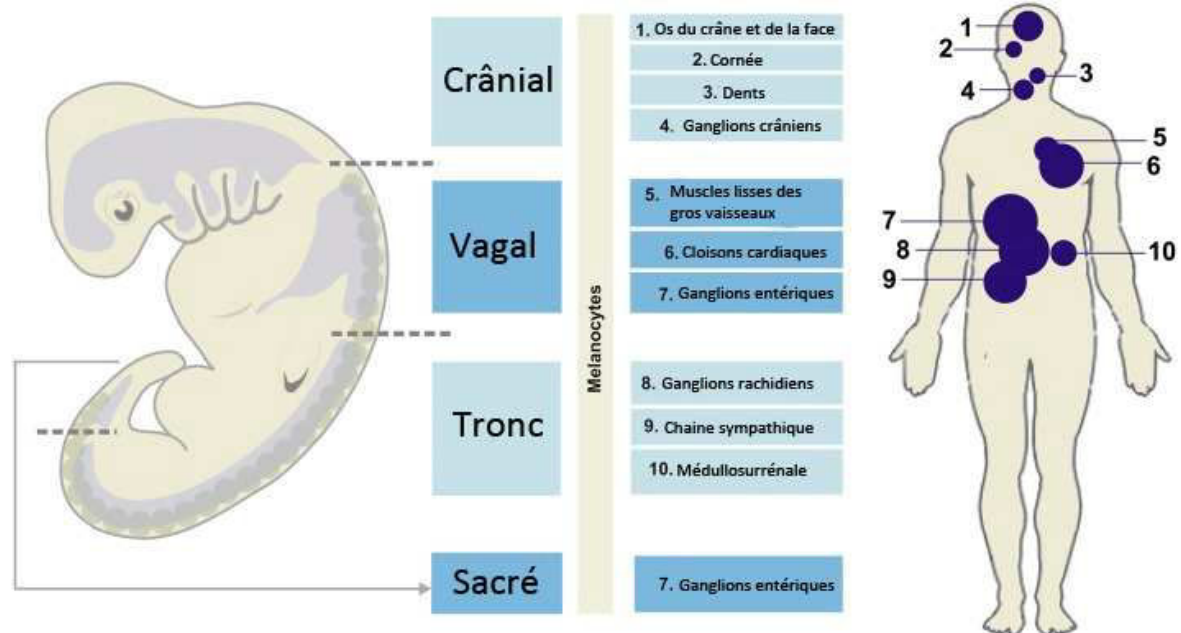


Figure 12 : Dérivés des CN

Les dérivés des CN sont indiqués en fonction de leur origine, le long de l'axe antéro-postérieur. Les mélanocytes de la peau dérivent des CN sur toute leur longueur. (Simões-Costa et Bronner, 2013)

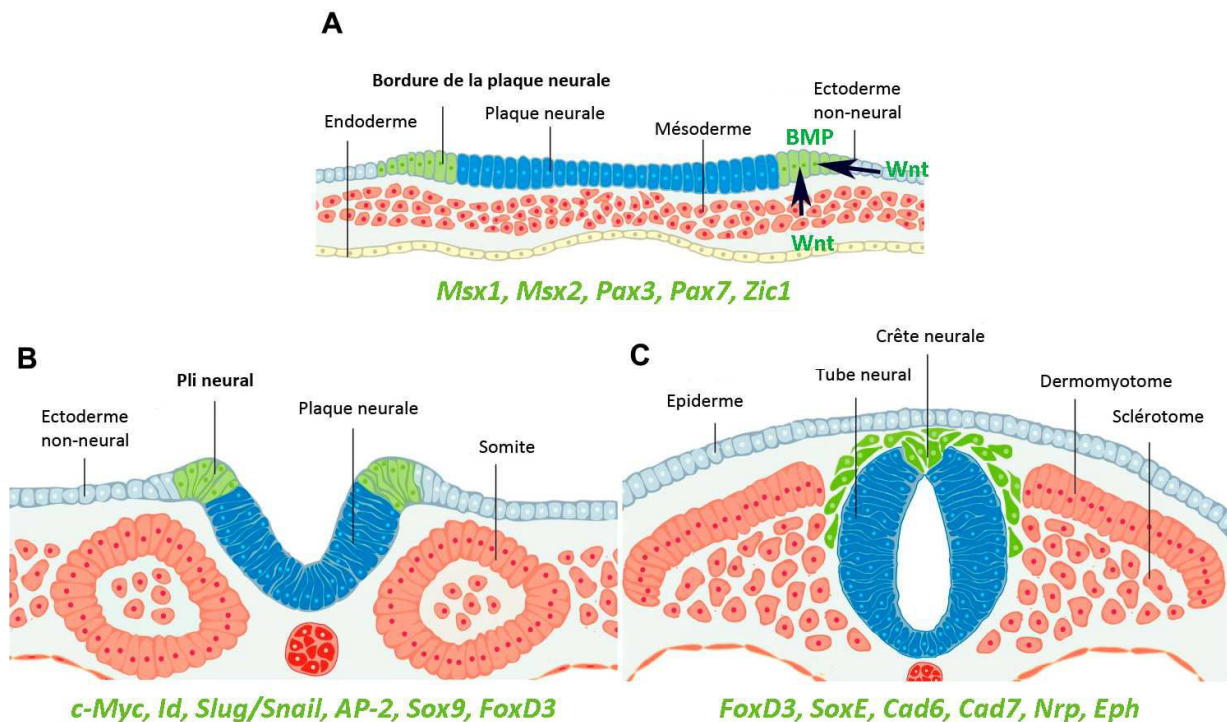


Figure 13 : Neurulation et formation des CCN

Ce schéma retrace les premières étapes du développement des CCN. **A** : Les futures CCN (vert) se trouvent en bordure de la plaque neurale (bleu foncé), à la frontière entre celle-ci et l'ectoderme non-neural. L'induction des CCN fait suite à l'influence des signaux BMP et Wnt ; **B** : Lors de la neurulation, la plaque neurale s'invagine et soulève les plis neuraux ; **C** : Après la fermeture du tube neural, les CCN perdent toute adhésion intercellulaire et subissent une transition épithélio-mésenchymateuse. Après délamination du tube neural, elles migrent largement dans tout l'embryon. A chaque étape, les gènes exprimés par les CCN sont indiqués en vert (Sauka-Spengler et Bronner-Fraser, 2008; Simões-Costa et Bronner, 2013).

Les CCN présomptives se trouvent en bordure de la plaque neurale, à la frontière avec l'ectoderme non-neural (futur épiderme) (Figure 13). Au cours de la neurulation, la plaque neurale s'invagine pour former le tube neural (futur système nerveux central). Cette invagination produit, à la frontière avec l'ectoderme non-neural, des crêtes longitudinales appelées plis neuraux et constituées de CCN pré-migratoires. Après la neurulation, l'ectoderme non-neural et le tube neural, fermé, sont séparés. Les CCN, alors en partie dorsale du tube neural, perdent leurs jonctions intercellulaires, subissent une transition épithélio-mésenchymateuse et se détachent pour quitter le tube neural et migrer dans les organes et tissus où elles se différencieront (Moury et Jacobson, 1990, Moury et Jacobson, 1989; Selleck et Bronner-Fraser, 1995; Simões-Costa et Bronner, 2013).

Les CN (prémigratoires ou au stade précoce de la migration) forment une structure hétérogène composée de cellules souches multipotentes et de cellules plus restreintes dans leurs options de différenciation. Au cours de leur migration, les progéniteurs issus des CN subissent des restrictions de lignages, sous l'influence combinée de facteurs intrinsèques et de signaux moléculaires exogènes rencontrés localement (Dupin, 2011).

La migration des CCN du tronc suit deux grands patrons. Un premier groupe de cellules migre entre les dermomyotomes des somites et l'ectoderme : cette voie constitue la **voie dorso-latérale**. Un

second groupe de cellules migre ventro-médialement entre le tube neural et le sclérotome des somites : cette voie constitue la **voie ventrale** (Douarin et Kalcheim, 1999) (Figure 14). Les dérivés des CCN troncales sont à l'origine de trois grands lignages : le **lignage neuronal**, à l'origine des neurones de ganglions sympathiques et rachidiens ; le **lignage glial**, à l'origine des cellules de Schwann ; le **lignage mélanocytaire** (ou mélanogène), à l'origine des mélanocytes (Joseph *et al.*, 2004; Thomas et Erickson, 2008). Nous nous intéresserons particulièrement ici à ces deux derniers lignages.

Le lignage mélanocytaire provient de CCN issues des voies dorso-latérale et ventrale alors que les lignages neuronaux et gliaux ne proviennent que de cellules issues de la voie ventrale (Adameyko *et al.*, 2009; Ernfors, 2010; Sommer, 2011).

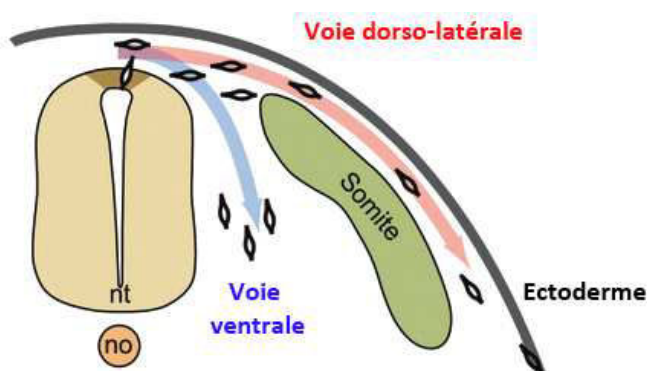


Figure 14 : Voies de migration adoptées par les CCN
nt = tube neural ; no = notochorde (d'après Thomas et Erickson, 2008)

2) Dans la voie dorso-latérale, les mélanoblastes émergent directement des crêtes neurales

Jusqu'à très récemment, on pensait que les précurseurs de mélanocytes migraient exclusivement dorso-latéralement pour atteindre l'ectoderme où ils se différencient en mélanocytes (Douarin et Kalcheim, 1999). Ces observations étaient basées sur des expériences de traçage cellulaire dont les plus connues sont les chimères caille-poulet développées par Nicole Le Douarin (Le Douarin et Teillet, 1970). Chez la souris, les méthodes utilisées étaient la coloration des CCN par des colorants vitaux (Serbedzija *et al.*, 1994, Serbedzija *et al.*, 1990) et le suivi de l'expression du gène *Dct* comme marqueur du lignage mélanocytaire (Steel *et al.*, 1992).

Dans ce modèle, les CCN à l'origine du lignage mélanocytaire, appelés précurseurs de mélanoblastes, après avoir quitté le tube neural, s'arrêtent temporairement dans une zone particulière appelée *Migration Staging Area* (MSA), espace délimité entre l'ectoderme, le tube neural et les somites (Weston, 1991). C'est dans la MSA qu'elles sont déterminées en tant que mélanoblastes (Serbedzija *et al.*, 1994, Serbedzija *et al.*, 1990). La migration commence à E8 et se termine à E12,5 chez la souris (Hirobe, 1995; Serbedzija *et al.*, 1994, Serbedzija *et al.*, 1990). Arrivés dans le mésenchyme sous-

épidermique, les mélanoblastes traversent la lame basale de l'épiderme entre E12 et E13 (Hirobe, 1995; Mayer, 1973) (Figure 15). Entre E14 et E16, les mélanoblastes colonisent les follicules pileux en formation (Hirobe, 1995, Hirobe, 1992; Jordan et Jackson, 2000). Comme nous l'avons vu précédemment, certains colonisent directement la matrice du bulbe pour se différencier en mélanocytes alors que d'autres colonisent le *bulge* pour y constituer une population de CSM (Nishimura *et al.*, 2002).

Depuis les CCN, le lignage mélanocytaire est donc représenté dans cette voie par les précurseurs de mélanoblastes, les mélanoblastes, les mélanocytes différenciés et les CSM. Chaque population présente, en plus de caractéristiques spatio-temporelles distinctes, un profil d'expression particulier et séquentiel dans lequel l'activation du gène *Mitf* constitue un événement clé, à l'origine de la détermination (Cooper et Raible, 2009; Levy *et al.*, 2006) (Figure 15 et Figure 16). Cette activation commence à E10,5, peu après la délamination du tube neural et dans la MSA. Deux autres gènes, *Pax3* et *Sox10*, ont un rôle majeur dans le développement du lignage mélanocytaire et, comme *Mitf*, seront abordés plus en détails dans la suite de ce manuscrit.

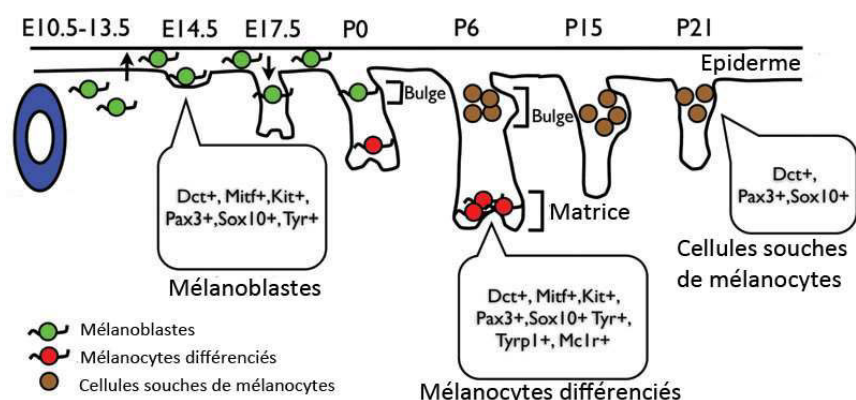


Figure 15 : Gènes exprimés par les cellules du lignage mélanocytaire chez la souris en fonction du temps

On reconnaît par ailleurs dans ce lignage des précurseurs de mélanoblastes qu'Opdecamp définit comme des cellules n'exprimant que *Mitf* et *Kit*, alors que les mélanoblastes expriment également *Dct* (Opdecamp *et al.*, 1997). E : Jour de développement embryonnaire ; P : Âge en jour. (Li, 2014)

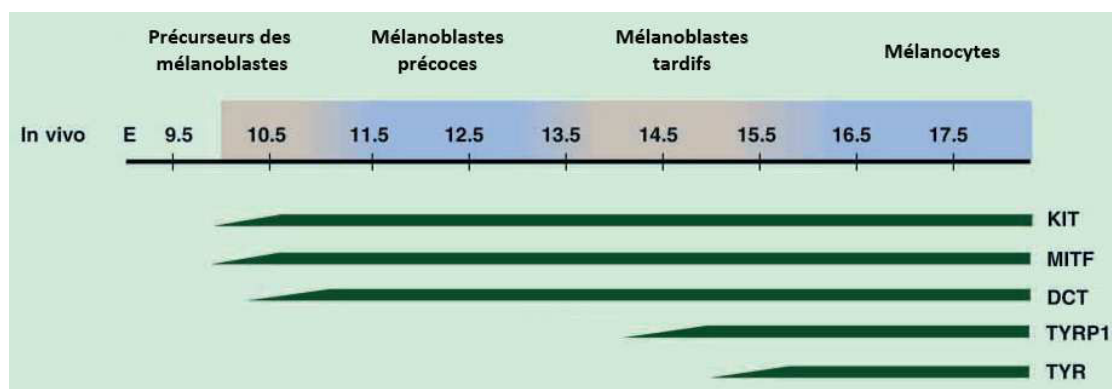


Figure 16 : Expression de gènes spécifiques du lignage mélanocytaire au cours du développement
MSA : Migration Stage Area (d'après Hou *et al.*, 2000).

3) Dans la voie ventrale, les mélanoblastes émergent d'un précurseur commun avec le lignage glial

Précédemment, nous avons vu que d'après les premières études de traçage cellulaire, les mélanocytes semblaient ne provenir que de cellules déterminées selon la voie dorso-latérale. Récemment, il a été montré que les mélanocytes ont également pour origine des cellules déterminées selon la voie ventrale qui émergent à partir d'un précurseur commun avec le lignage glial (Adameyko *et al.*, 2009; Ernfors, 2010). Pour cette raison, nous détaillerons ici les étapes de la détermination du lignage glial avant d'aborder l'émergence du lignage mélanocytaire suivant la voie ventrale.

❖ Détermination du lignage glial

Les CCN qui empruntent la voie ventrale migrent et se rassemblent pour former les ganglions rachidiens. Certaines de ces cellules sont déjà déterminées en tant que neurones alors que d'autres demeurent des progéniteurs non déterminés (Ernfors, 2010). Vers E11,5, des axones se développent au départ des ganglions rachidiens pour constituer les futurs nerfs périphériques. Ces nerfs servent de support à la migration de cellules indifférenciées de CN depuis les ganglions rachidiens vers la périphérie. Ces cellules sont des précurseurs de cellules de Schwann (PCS) (Jessen et Mirsky, 2005; Woodhoo et Sommer, 2008). Elles se différencient par la suite en cellules de Schwann immatures, puis en cellules de Schwann non-myélinisantes ou myélinisantes (Figure 17) (Jessen et Mirsky, 2005). Dans la structure des nerfs périphériques adultes, les cellules de Schwann entourent les axones pour constituer des fibres nerveuses séparées par un tissu conjonctif appelé endonèvre et composé de fibres conjonctives, de fibroblastes endoneuraux et de vaisseaux sanguins. L'ensemble est délimité par un périnèvre constitué de cellules périneurales (Joseph *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 1976) (Figure 18). Il a récemment été montré que le lignage glial partage un précurseur commun avec le lignage myofibroblastique à l'origine des fibroblastes endoneuraux (Joseph *et al.*, 2004)

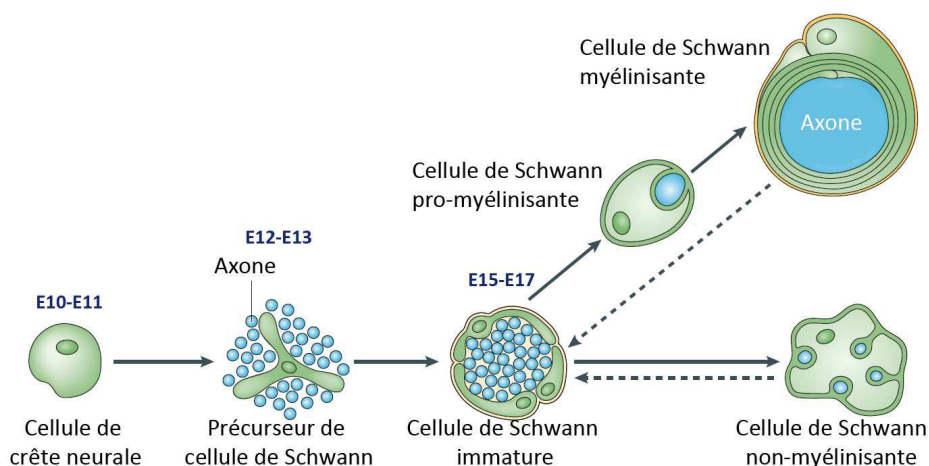


Figure 17 : Cellules du lignage glial

Les dates d'apparition au cours de l'embryogénèse sont indiquées pour la souris. (Jessen et Mirsky, 2005)

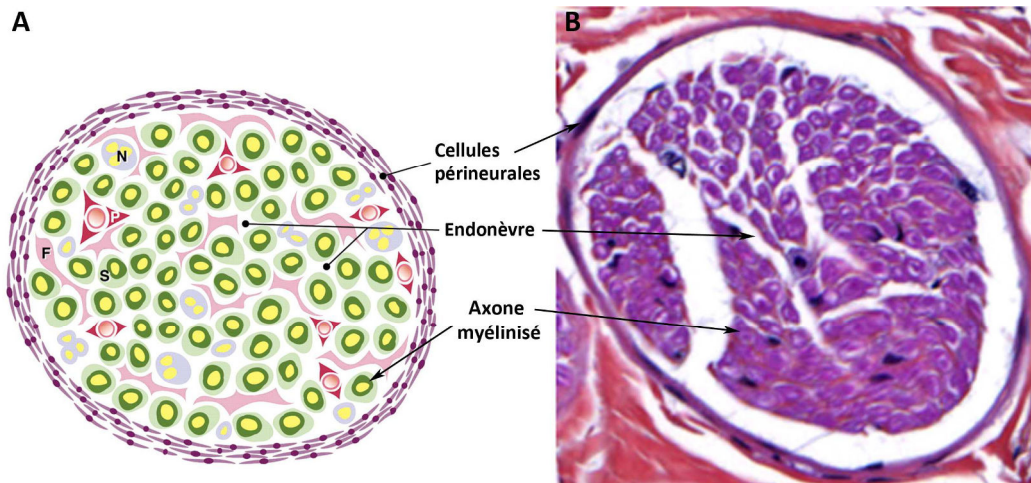


Figure 18 : Structure histologique d'un nerf périphérique

A : Schématisation d'une coupe transversale de nerf périphérique. Les cellules de Schwann et les fibroblastes endoneuraux sont des cellules dérivées des CCN. N = Fibres nerveuses amyéliniques ; F = Fibroblastes endoneuraux ; S = Cellules de Schwann autour d'un axone myélinisé ; P = Péricytes autour de capillaires sanguins (Joseph *et al.*, 2004)

B : Coupe histologique d'un nerf périphérique de souris en section transversale. Coloration hémalum-éosine-safran.

La différenciation progressive depuis les CCN vers les cellules de Schwann s'accompagne d'une expression séquentielle de protéines dont la combinaison définit des profils propres à chaque type cellulaire du lignage glial (Jessen et Mirsky, 2005)(Figure 19).

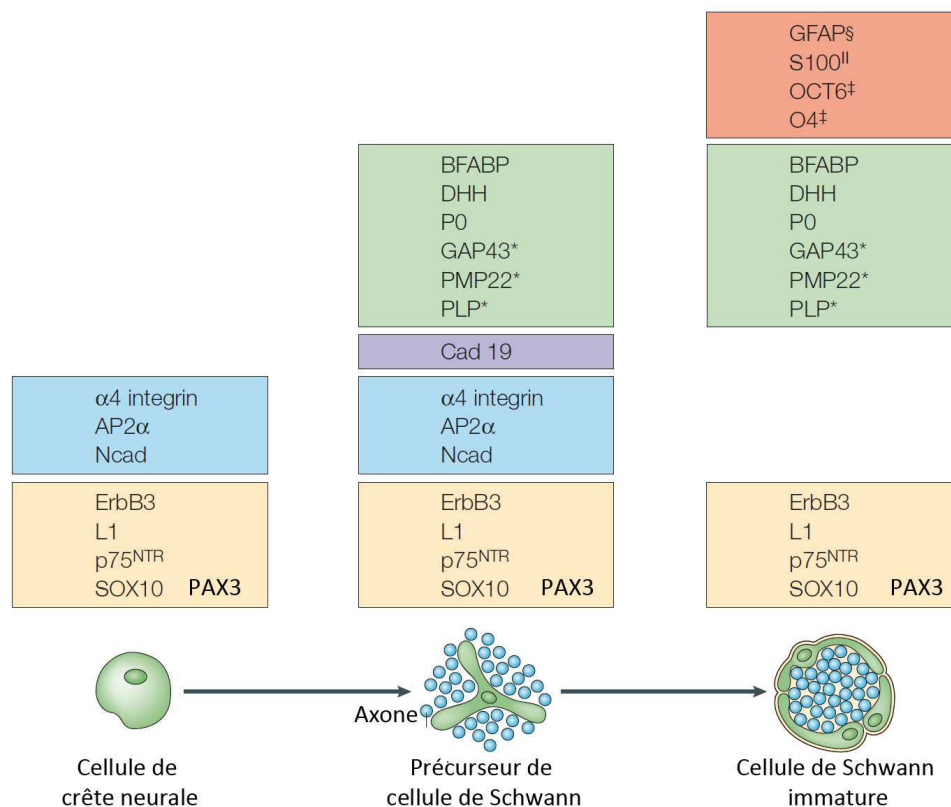


Figure 19 : Protéines exprimées par les cellules du lignage glial au cours du développement

Les profils d'expression communs sont indiqués par des blocs de même couleur. La cadhérine 19 (Cad 19) est uniquement exprimée par les PCS (d'après Jessen et Mirsky, 2005).

Parmi ces protéines, signalons PAX3, SOX10, PLP (Proteolipid Protein), DHH (Desert Hedgehog), S100, GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), BFABP (Brain Fatty Acid-Binding Protein). Signalons également que les événements de la différenciation du lignage glial sont fortement dépendants de signaux de survie, facteurs de croissance et signaux de différenciations en provenance des axones auxquels les cellules de Schwann et leurs précurseurs sont intimement associés. Par exemple, la neureguline 1 (NRG1), exprimée par les axones et dont le signal est médié par la liaison au récepteur à activité tyrosine kinase ErbB3 à la surface des cellules gliales, constitue un facteur de survie essentiel aux PCS (Dong *et al.*, 1995; Grinspan *et al.*, 1996; Jessen et Mirsky, 2005).

❖ **Des mélanoblastes sont déterminés à partir des précurseurs de cellules de Schwann**

Récemment, il a été montré que les mélanocytes ont également pour origine des cellules déterminées selon la voie ventrale et ayant pour origine les précurseurs de cellules de Schwann (Adameyko *et al.*, 2009; Ernfors, 2010). Si cette seconde origine a été si longtemps ignorée, c'est probablement parce que les études initiales avaient sous-évalué l'origine des mélanocytes cutanés des régions ventrales et des membres (Adameyko et Lallemand, 2010).

Adameyko et ses collaborateurs ont montré, chez le poulet et la souris, que certaines CCN migrent ventralement le long des trajets nerveux pour s'engager dans la destinée mélanocytaire après s'être détachées de ces nerfs (Adameyko *et al.*, 2009)(Figure 20). Chez la souris, cette démonstration s'appuie sur des traçages cellulaires à partir d'une approche transgénique *via* un système inductible Cre/LoxP et une activation conditionnelle par le tamoxifène. Des souris Cre-ERT2 exprimant la recombinaise Cre sous contrôle du promoteur de la PLP ont pour cela été croisées avec des souris rapportrices Rosa26-YFP possédant une cassette stop floxée empêchant l'expression de la Yellow Fluorescent Protein (YFP). La PLP est une protéine exprimée par les cellules de Schwann et leurs précurseurs (SCP)(Leone *et al.*, 2003). Selon ce schéma expérimental, après injection de tamoxifène, les souris issues de ce croisement n'expriment la YFP que dans les précurseurs des cellules de Schwann et leurs dérivés. Les traçages ont ainsi montré qu'une seconde source de mélanocytes, plus tardive que la source dorso-latérale (E12 contre E10,5), provient des nerfs. Les auteurs ont déterminé que ces mélanocytes ont pour origine des mélanoblastes issus de PCS et que ces mélanoblastes colonisent surtout la peau du tronc et des membres. Dans ces régions, les auteurs affirment que la proportion de mélanocytes originaires de la voie ventrale serait supérieure à ceux originaires de la voie dorso-latérale. Toutefois, le nombre exact de mélanocytes de la peau adulte ayant pour origine les nerfs n'est pas encore clairement déterminé à ce jour. Il est en effet possible que la lignée de souris Cre-ERT2 utilisée par Adameyko exprime, même transitoirement, la recombinaise Cre dans quelques CCN multipotentes voire dans certains mélanocytes issus de la voie dorso-latérale (Leone *et al.*, 2003; Michalski *et al.*, 2011; Sommer, 2011). Des études plus fines sont à présent nécessaires pour déterminer plus précisément la contribution de chaque voie.

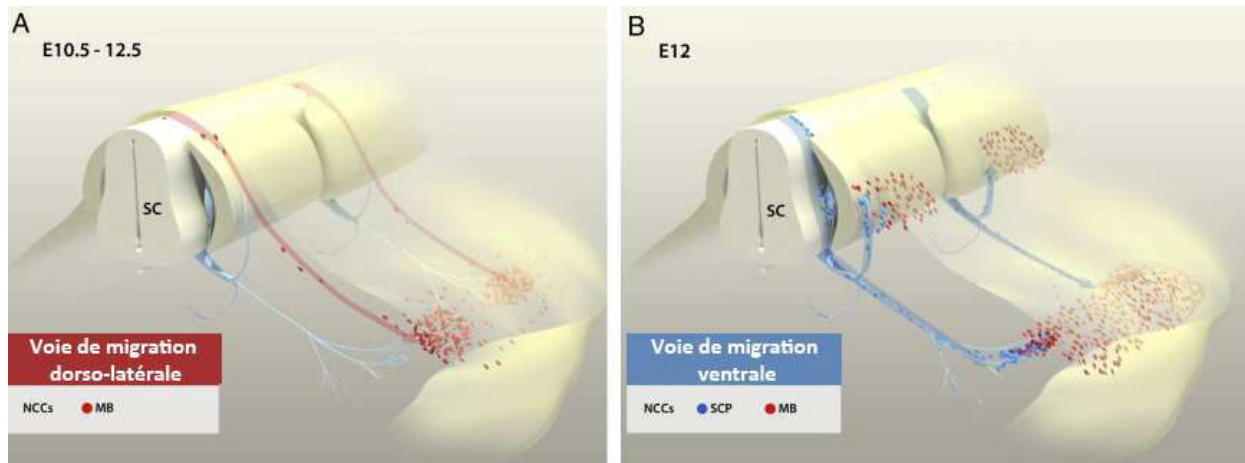


Figure 20 : Origine cellulaire et voies de migration du lignage mélanocytaire

A : Première source de mélanoblastes par la voie dorso-latérale entre E10,5 et E12,5 chez la souris. Les mélanoblastes sont ici spécifiés peu après leur délamination du tube neural et migrent sous l'épiderme, en se divisant peu, pour coloniser des zones cutanées définies où ils se multiplieront massivement.

B : Seconde source de mélanoblastes, déterminés à partir des PCS, vers E12 chez le souris (Adameyko et al., 2009). Les CCN de la voie ventrale n'adoptant pas une destinée neuronale suivent une destinée gliale et deviennent des PCS. Ces derniers migrent en suivant les rameaux nerveux dorsaux ou ventraux. A l'extrémité distale de ces rameaux, certains PCS se détachent des nerfs, se différencient en mélanoblastes et migrent dans la peau où ils se multiplient.

MB : Mélanoblaste ; NCC : Cellules de crêtes neurales ; SCP : Précurseurs de cellules de Schwann (d'après Ernfors, 2010).

C - Détermination du lignage mélanocytaire

1) Modèle hiérarchique de la détermination des CCN en mélanoblastes

La chronologie de la détermination des CCN est un sujet difficile qui a été abordé dans les années 80 par des méthodes d'analyses clonales chez le poulet et la caille (Thomas et Erickson, 2008). Ces études ont non seulement permis de déterminer les potentiels de développement d'une cellule de crête neurale après culture *in vitro*, mais aussi les sites de différenciation de sa descendance *in vivo*. Les premières études consistaient en des clonages par dilution limite où des CCN, issues de tubes neuraux de caille japonaise disséqués et mis en culture 48 heures auparavant, étaient ensemencées à densité clonale. Après différenciation, seules 5% des colonies avaient une population mixte, les autres étaient uniquement constituées de cellules pigmentées ou non pigmentées. Ces expériences montraient donc que 48 heures après avoir quitté le tube neural, la majorité des mélanoblastes sont déjà déterminés (Cohen et Konigsberg, 1975). Si l'ensemencement est pratiqué plus tôt, soit après 18 heures, plus de 50% des clones sont exclusivement constitués de mélanocytes, indiquant qu'une proportion similaire de mélanoblastes est déjà spécifiée 18 heures après avoir quitté le tube neural (Sieber-Blum et Cohen, 1980).

Plus tard, des expériences de traçage cellulaire *in vitro* par le rhodamine-lysine dextran (RLD) ont permis de déterminer plus précisément la chronologie de la détermination. Il a ainsi été démontré, chez la caille, que la plupart des CCN délaminant dans les 6 premières heures sont soit des progéniteurs

bipotents de cellules neurales/gliales, soit des précurseurs neuronaux ou gliaux. Seuls 10% de ces cellules, pour la plupart des précurseurs bipotents de cellules gliales/mélanocytaires, sont capables de donner naissance à des mélanocytes (Henion et Weston, 1997). Les mélanoblastes déterminés, quant à eux, ne migrent pas durant les 6 premières heures. En revanche, au delà de 6 heures, la proportion de cellules capable de donner des mélanocytes augmente. Quelques unes sont des précurseurs bipotents de cellules gliales/mélanocytaires mais la plupart sont des mélanoblastes déjà déterminés. De plus, la moitié des cellules migratoires précoces sont multipotentes alors que 87% des cellules marquées 30-36 heures après leur délamination sont unipotentes (Henion et Weston, 1997).

Ces observations ont conduit à proposer un modèle hiérarchique de détermination progressive des CCN. Pour le mélanoblaste, le précurseur immédiat serait, selon ce modèle, une cellule bipotente capable de générer des cellules gliales et des mélanocytes, elle-même précédée par un précurseur tripotent de neurones, cellules gliales et mélanocytes (Figure 21). Ceci reste un modèle et il n'est pas clair à l'heure actuelle si tous les mélanoblastes passent par toutes les étapes de détermination ou si certains sont directement spécifiés (Thomas et Erickson, 2008).

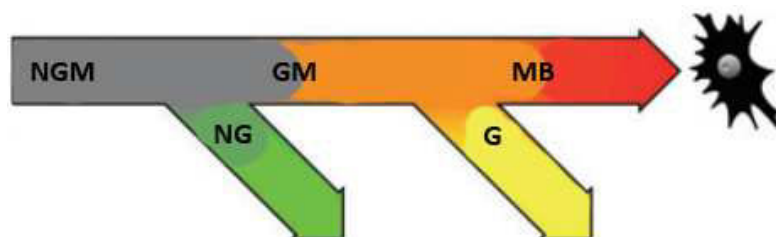


Figure 21 : Modèle hiérarchique de la détermination progressive des mélanoblastes à partir des CN troncales
Les progéniteurs multipotents subissent progressivement une restriction de potentialité jusqu'à produire des mélanoblastes déterminés. NGM : Progéniteur tripotent neuronal/glial/mélanocytaire ; NG : Précurseur bipotent neuronal/glial ; GM : Précurseur bipotent glial/mélanocytaire ; Précurseur glial déterminé ; MB : Mélanoblaste déterminé (d'après Thomas et Erickson, 2008).

2) Les CCN adoptent une voie de migration en fonction de leur détermination

Pour une cellule de CN, le choix entre la voie dorso-latérale et la voie ventrale est lié à sa détermination. Chez le poulet, il a ainsi été démontré par des expériences de greffes que les CCN neurogènes (à l'origine des neurones) ne peuvent entrer dans la voie dorso-latérale ni y migrer, quel que soit le stade de développement ou le niveau d'implantation le long de l'axe antéro-postérieur (Erickson et Goins, 1995). A l'inverse, si des mélanoblastes issus de cultures de CCN sont greffés sur de jeunes embryons, pour lesquels la migration dorsolatérale n'a pas encore débuté, ces mélanoblastes migrent immédiatement en suivant la voie dorsolatérale. Cette différence de patron de migration entre cellules neurogènes et mélanoblastes est le reflet d'une différence d'expression en récepteurs membranaires et en molécules de signalisation liée à leur détermination (Harris et Erickson, 2007).

Chez la souris, deux couples de facteurs de croissance/récepteurs sont bien connus pour guider la migration des mélanoblastes dans la voie dorso-latérale : il s'agit du récepteur à activité tyrosinase Kit et du récepteur Ednrb qui sont exprimés par les mélanoblastes et ont pour ligands respectifs Kitl (Kit ligand ou Stem Cell Factor (SCF)) et l'endothéline 3 (Edn3). Le rôle de ces protéines dans le développement des mélanocytes chez la souris a pu être étudié grâce aux mutants de couleur pour chacun des gènes correspondants. Pour chaque couple, les mutations dans le gène du récepteur et du ligand se traduisent par un phénotype similaire. Au niveau du pelage, on observe une dilution et/ou des taches blanches plus ou moins grandes, voire un pelage entièrement blanc pour les mutants homozygotes viables de *Kit/Kitl* (Silvers, 1979). Ces caractéristiques traduisent le rôle de Kit/Kitl et Ednrb/Edn3 dans la migration et la survie des mélanoblastes (Jordan et Jackson, 2000; Mackenzie *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 1996).

Outre la voie de migration, le modèle hiérarchique de détermination des CCN implique, à un moment donné, un virage phénotypique au cours duquel le profil d'expression génique se modifie pour conduire la cellule à sa différenciation terminale. Pour le lignage mélanocytaire, de nombreux facteurs de transcription ont été impliqués dans la détermination des mélanoblastes dont les principaux sont *Sox10*, *Pax3* et *Mitf* (*Microphthalmia-associated transcription factor*), ce dernier étant considéré comme le régulateur-maître de la détermination en mélanoblaste (Sommer, 2011; Thomas et Erickson, 2008). Un quatrième gène, *FoxD3*, apparaît au contraire comme un répresseur de cette détermination.

D - *Mitf*, *Sox10*, *Pax3*, *Foxd3* : 4 gènes impliqués dans la détermination du lignage mélanocytaire

1) *Mitf*

❖ Phénotype des mutants

De très nombreuses mutations ont été décrites au locus *Microphthalmia*. Si le nom du locus fait référence aux anomalies oculaires (microphthalmie) qui leur sont souvent associées, c'est sur le pelage que le phénotype est le plus évident. Alors que les homozygotes ont un pelage généralement blanc ou à pigmentation très réduite, les hétérozygotes arborent des taches blanches sur le ventre et/ou un pelage à pigmentation diluée (Figure 22). On observe également, en plus de la microphthalmie, une dégénérescence rétinienne et/ou une surdité précoce, conséquences d'une absence de mélanocytes dans la choroïde et dans l'oreille interne (Silvers, 1979).

Ces anomalies rappellent le syndrome de Waardenburg de type II de l'homme auquel sont associées des mutations dans le gène *MITF* et qui se traduit par une surdité et des anomalies de la pigmentation (Tassabehji *et al.*, 1994).

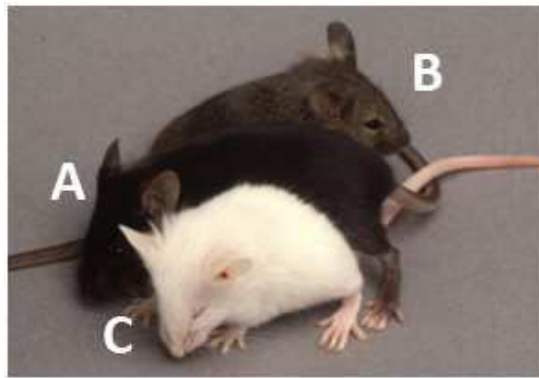


Figure 22 : Phénotype de souris mutantes pour le gène *Mitf*

A : Souris de phénotype sauvage; **B** : Souris hétérozygote *Mitf*^{Vga-9/+} montrant un pelage de couleur diluée par rapport au contrôle ; **C** : Souris homozygote *Mitf*^{Vga-9/Vga-9} caractérisée par un pelage entièrement blanc et une microphthalmie (Arnheiter, 2010).

❖ Structure

Le gène *Mitf* se trouve sur le chromosome 6 de la souris, au locus *Microphthalmia*, où il s'étend sur plus de 50kb. Il code un facteur de transcription, MITF, contenant un domaine d'activation de la transcription et un domaine de type hélice-boucle-hélice (bHLH-Zip) responsable de la liaison à l'ADN et de la dimérisation de la protéine (Hallsson *et al.*, 2000)(Figure 23). Plusieurs isoformes de cette protéine sont décrites (MITF-M, MITF-A, MITF-H, MITF-C etc.) mais des expériences à partir de mutants de couleurs ont permis d'identifier MITF-M comme l'isoforme spécifique du lignage mélanocytaire de la peau (Yajima *et al.*, 1999).

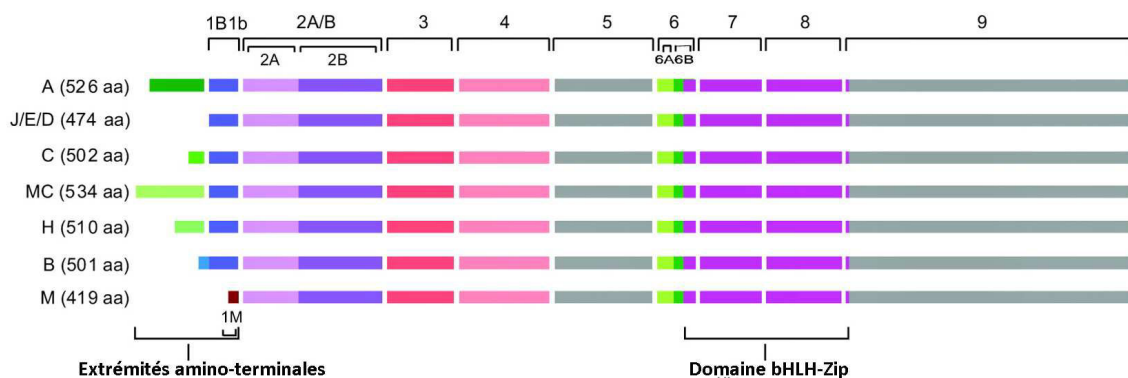


Figure 23 : Structure de la protéine MITF chez la souris

Seule la partie amino-terminale diffère entre les isoformes. L'isoforme MITF-M est l'isoforme spécifique du lignage mélanocytaire de la peau. aa = acide aminés (Bharti *et al.*, 2008).

❖ Fonction

L'expression du gène *Mitf* est considérée comme l'élément déterminant dans la détermination des CCN en mélanoblastes (Cooper et Raible, 2009; Levy *et al.*, 2006). Dans le lignage mélanocytaire, il est donc considéré comme le gène-maître et intervient également dans la survie et la prolifération.

Concernant la détermination, l'étude de souris mutantes homozygotes pour un allèle produisant une protéine MITF non fonctionnelle a montré que *Mitf* était nécessaire au passage de précurseurs de mélanoblastes aux mélanoblastes (Nakayama *et al.*, 1998; Opdecamp *et al.*, 1997). *In vitro*, l'expression ectopique de *Mitf* dans des fibroblastes ou des neurones de rétine de poulet entraîne l'apparition de caractéristiques de mélanocytes (Planque *et al.*, 1999; Tachibana *et al.*, 1996). Dans un contexte pathologique, un phénomène similaire se produit dans les sarcomes à cellules claires de l'homme. Bien que la cellule d'origine ne soit pas mélanocytaire, cette tumeur présente en effet des caractéristiques de mélanome en raison d'une translocation spécifique entre les gènes *Ewing's Sarcoma-associated gene* (EWS) et *Activating transcription factor 1* (ATF1). Il en résulte une protéine de fusion EWS-AFL1 qui se fixe sur le promoteur de *MITF*, provoque son expression ectopique et confère aux cellules tumorales des caractéristiques de mélanocytes (Davis *et al.*, 2006; Malchau *et al.*, 2007).

Mitf est aussi impliqué dans la survie des cellules du lignage mélanocytaire, aussi bien pour la survie initiale des précurseurs de mélanoblastes que pour la survie des mélanocytes en culture (Boissy et Lamoreux, 1995; Hornyak *et al.*, 2001).

Mitf est enfin impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire des mélanocytes normaux et tumoraux (Levy *et al.*, 2006). Au cours du développement du lignage mélanocytaire, les études sont contradictoires quant à son rôle stimulateur ou inhibiteur de la prolifération (Hornyak *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 1998). Cette absence de consensus reflète probablement un ajustement du rôle de *Mitf* en fonction du contexte cellulaire et de l'isoforme exprimée (Bismuth *et al.*, 2005). Dans les mélanomes humains et murins, *Mitf* est également capable de stimuler (Garraway *et al.*, 2005; King *et al.*, 1999) ou d'inhiber la prolifération cellulaire (Loercher *et al.*, 2005). Il semble que le niveau d'expression de *Mitf* agisse comme un rhéostat sur les capacités prolifératives des cellules de mélanome. Dans ce modèle, une expression trop forte de *Mitf* inhibe la prolifération et aboutit à la différenciation cellulaire alors qu'une expression trop faible aboutit à la sénescence des cellules (Carreira *et al.*, 2006; Goding, 2011; Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Récemment, il a été montré une régulation de *Mitf* par le facteur de transcription ZEB2 (Zinc finger E-box Binding protein 2, également appelé ZFH1B (Zinc Finger Homeobox 1b) ou SIP (Smad Interacting Protein 1)), impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Les souris invalidées pour *Zeb2* dans le lignage mélanocytaire montrent des anomalies de migration des mélanoblastes ainsi que des anomalies de la différenciation des mélanocytes (hypopigmentation, mélanosomes anormaux) avec parallèlement, une diminution de l'expression de *Mitf* (Denecker *et al.*, 2014).

2) *Sox10*

❖ Phénotype des mutants

Le gène *SRY-box containing gene10* (*Sox10*) est codé au locus *Dominant Megacolon* (*Dom*) du chromosome 15 de la souris (Herbarth *et al.*, 1998). Le phénotype des souris hétérozygotes porteuses de la mutation spontanée *Dom* est caractérisé par une tache blanche ventrale et des pattes blanches, dues à l'absence de mélanocyte (Figure 24). Elles présentent par ailleurs un mégacôlon consécutif à l'absence de cellules du système nerveux entérique, lequel est responsable de la mort des animaux après le sevrage (Southard-Smith *et al.*, 1998). A l'état homozygote, la mutation entraîne une létalité embryonnaire. Chez l'homme, les mutations du gène *SOX10* ont été associées initialement au syndrome de Waardenburg de type IV qui associe des troubles de l'audition et de la pigmentation à une aganglionose colique congénitale (maladie de Hirschsprung) (Bondurand *et al.*, 2007; Pingault *et al.*, 1998; Southard-Smith *et al.*, 1999). Les souris Dominant mégacôlon constituent un modèle de cette maladie (Tachibana *et al.*, 2003). Depuis ces descriptions, des mutations dans le gène *SOX10* ont été retrouvées dans le syndrome de Waardenburg de type II (environ 15% des cas), dans le syndrome PCWH (Peripheral demyelinating myelopathy, Central dysmyelinating leucodystrophy, Waardenburg syndrome, Hirschsprung disease), dans le syndrome de Kallmann associant anosmie et hypogonadisme hypogonadotrope, ainsi que dans un cas de maladie de Hirschsprung isolée (Bondurand *et al.*, 2007; Pingault *et al.*, 2013, Pingault *et al.*, 2010; Sánchez-Mejías *et al.*, 2010)



Figure 24 : Phénotype d'une souris mutante hétérozygote au locus *Dominant Megacolon Sox10^{tm1Weg}/Sox10⁺* (*Sox10^{lacZ}*)

Les souris *Sox10^{lacZ/+}* ont le même phénotype que les souris *Sox10^{Dom/+}*. (Photo : M. Wegner / Lidia Kos, site <http://www.espcr.org/micemut/locussox10.html>)

❖ Structure

Sox10 appartient à la famille des gènes *Sox* qui codent des facteurs de transcription. Tous possèdent un domaine de liaison à l'ADN homologue au domaine HMG (High Mobility Group) du gène *SRY* qui détermine le sexe chez les mammifères (Pevny et Lovell-Badge, 1997). Les 20 protéines qui

composent la famille SOX sont classées en 9 groupes, suivant les acides aminés qui composent le domaine HMG, le pourcentage d'homologie et la présence d'autres domaines communs. Les protéines SOX sont très fortement exprimées pendant l'embryogenèse et leur expression est maintenue dans les tissus adultes, avec un profil d'expression propre à chaque protéine. *Sox10* code la protéine SOX10 qui, avec SOX8 et SOX9 forme le groupe SoxE (Wright *et al.*, 1993). *Sox10* est exprimé dans les ganglions sympathiques dorsaux et crâniens, dans les cellules de Schwann, dans le système nerveux entérique ainsi que dans les cellules localisées dans la voie de migration dorso-latérale qu'empruntent les mélanoblastes en migration (Southard-Smith *et al.*, 1998). *Sox10* est par ailleurs exprimée dans les mélanocytes (Cook *et al.*, 2005; Lang *et al.*, 2005).

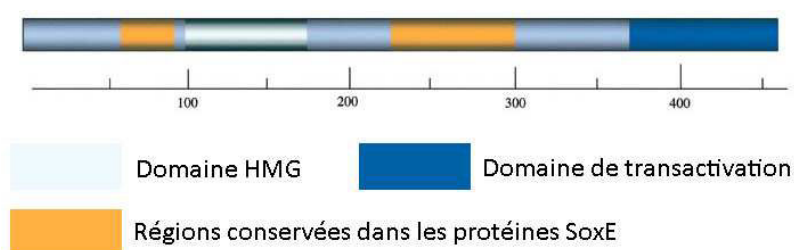


Figure 25 : Structure de la protéine SOX10
(d'après Mollaaghababa et Pavan, 2003)

❖ Fonction

SOX10 assure plusieurs fonctions dans le développement des NC et de leurs dérivés. Citons principalement la spécification des CCN et la maintenance pour certaines d'entre elles à l'état de cellule souche (Hou et Pavan, 2008; Kelsh, 2006). Plus particulièrement, dans le lignage mélanocytaire, SOX10 est indispensable pour la survie, la migration et la différenciation (Paratore *et al.*, 2001; Sonnenberg-Riethmacher *et al.*, 2001; Southard-Smith *et al.*, 1998; Wegner, 2005). Les souris homozygotes pour l'allèle *SoxDom* ne montrent à E11,5 aucune cellule exprimant MITF, KIT ou DCT, et les CCN ne donnent aucune cellule pigmentée en culture (Paratore *et al.*, 2001; Potterf *et al.*, 2001). SOX10 est donc nécessaire pour la détermination des précurseurs de mélanoblastes chez la souris. Dans la peau adulte, SOX10 joue également un rôle dans le maintien de la population de CSM : l'inactivation de *Sox10* dans le lignage mélanocytaire aboutit en effet à une perte des CSM et des mélanocytes différenciés tandis que la surexpression de *Sox10* dans ce même lignage aboutit à une différenciation prématurée des CSM et à leur perte. Dans les deux cas, on observe un blanchiment du pelage (Harris *et al.*, 2013).

Il a été montré que SOX10 se lie préférentiellement aux régions amplificatrices de plusieurs gènes impliqués dans la mélanogenèse dont *Mitf*, *Dct*, *Tyr* et *Tyrb1* (Lang *et al.*, 2005; Murisier *et al.*, 2007; Potterf *et al.*, 2001). De plus, SOX10, en synergie avec PAX3, active l'expression de *Mitf* (Bondurand *et al.*, 2000)(Figure 26).

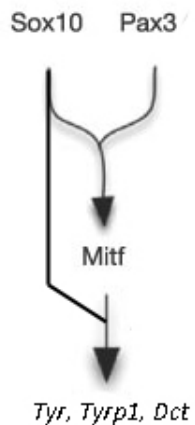


Figure 26 : Régulation de la différenciation mélanocytaire par SOX10
(d'après Harris *et al.*, 2010; Lang *et al.*, 2005)

3) *Pax3*

❖ Phénotype des mutants

Le gène *paired box gene 3 (Pax3)* est codé au locus *Spotch* (Epstein *et al.*, 1991a, Epstein *et al.*, 1991b). Le phénotype des mutants pour *Pax3* est plus ou moins sévère. Les mutations entraînent des anomalies de développement affectant le cœur, les ganglions spinaux, le tube neural, la colonne vertébrale, les muscles appendiculaires, ainsi que certaines cellules en migration telles que les CCN et les cellules précurseurs des muscles (Machado *et al.*, 2001). Chez les souris hétérozygotes pour les mutations de *Pax3*, on observe des taches blanches sur le ventre, l'extrémité des pattes et de la queue (Figure 27). Les mutations à l'état homozygote sont toujours létales et associées à des anomalies graves du tube neural ainsi que des CN et de leurs dérivés (Epstein *et al.*, 1993, Epstein *et al.*, 1991b; Goulding *et al.*, 1993). Chez l'homme, le syndrome de Waardenburg de types I et III est causé respectivement par des mutations hétérozygotes et homozygotes dans le gène *PAX3* (Pingault *et al.*, 2010). Ce syndrome comprend des défauts de pigmentation et de l'audition, des anomalies de la face et du crâne ainsi que des anomalies musculo-squelettiques appendiculaires (Hoth *et al.*, 1993; Tassabehji *et al.*, 1994).



Figure 27 : Phénotype d'une souris hétérozygote pour la mutation *Spotch*
Les souris hétérozygotes ont des taches blanches sur le ventre, les pattes et la queue (Baxter *et al.*, 2004).

❖ Structure

Le gène *Pax3* appartient à la famille des gènes *Pax* qui comptabilise 9 membres, hautement conservés et codant des facteurs de transcription. Ceux-ci sont caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN appelé *paired* (Figure 28). Certaines protéines PAX, comme PAX3, possède un second domaine de liaison à l'ADN appelé homéodomaine (Blake et Ziman, 2014). Chez l'homme comme chez la souris, plusieurs isoformes de PAX3 ont été décrites (Blake et Ziman, 2014, Blake et Ziman, 2005). *Pax3* est non seulement exprimé par les mélanoblastes et les mélanocytes, mais il est aussi le seul gène *Pax* à être exprimé dans le lignage mélanocytaire (Cook *et al.*, 2005; Galibert *et al.*, 1999).

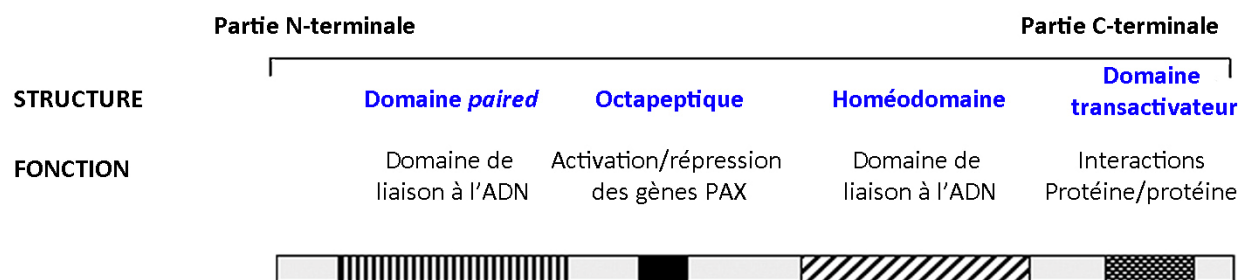


Figure 28 : Structure de la protéine PAX3
(d'après Thompson et Ziman, 2011)

❖ Rôle

PAX3 joue un rôle essentiel dans le développement des CN mais aussi dans celui des muscles et de l'appareil cardiovasculaire. Il est indispensable à la spécification des CN, et ce chez tous les vertébrés (Buckingham et Relaix, 2007). Une inactivation de PAX3 aboutit à un retard de migration des CCN qui a été montré *ex vivo* (Moase et Trasler, 1990). PAX3 promeut par ailleurs l'expansion de la population de mélanoblastes. On pense enfin qu'il intervient dans la balance entre mélanoblastes différenciés et mélanoblastes indifférenciés (Lang *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 1998). Plusieurs gènes spécifiques du lignage mélanocytaire, comme *Mitf* et *Dct*, ont en effet un motif consensus de liaison à *Pax3* dans leur région promotrice ou amplificatrice, et leur expression semble directement régulée par PAX3 (Lang *et al.*, 2005). *Mitf* est par ailleurs transactivé par l'action synergique de PAX3 et de SOX10 (Bondurand *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 1998). En revanche, alors que *Dct* est transactivé par l'action synergique de MITF et SOX10, PAX3 agit parallèlement comme un répresseur de la transcription de *Dct* pour antagoniser l'action du couple MITF/SOX10 (Figure 29). Ce mécanisme permet de limiter la différenciation terminale de mélanoblastes immatures jusqu'à ce que la répression exercée par PAX3 soit levée par des stimuli externes relayés par la voie Wnt (Lang *et al.*, 2005). PAX3 joue donc un rôle à la fois dans l'engagement vers la destinée mélanocytaire mais maintient simultanément les mélanoblastes immatures dans un état indifférencié (Lang *et al.*, 2005).

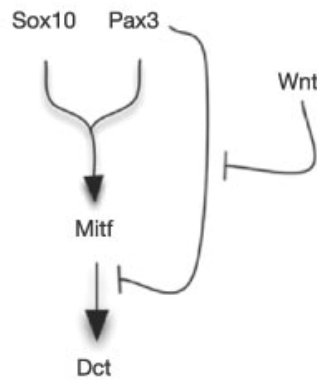


Figure 29 : Régulation de la différenciation mélanocytaire par PAX3

PAX3 active la cascade de différenciation mélanocytaire tout en réprimant l'activation de *Dct* par MITF afin de limiter la différenciation des mélanoblastes (d'après Lang *et al.*, 2005).

4) *Mitf*, *Sox10* et *Pax3* régulent la différenciation mélanocytaire

Les gènes *Mitf*, *Sox10* et *Pax3* interagissent donc pour réguler l'expression des gènes de la mélanogénèse (*Dct*, *Tyr*, *Tyrb1*) et ainsi contrôler la différenciation mélanocytaire. Tous les mécanismes de régulation ne sont cependant pas élucidés et il existe par ailleurs des différences entre les observations *in vitro* et *in vivo*. Plus largement, des interactions avec les voies de signalisation impliquées dans le développement et la différenciation du lignage mélanocytaire, comme la voie de l'endothéline 3 ou de KIT, sont également connues. Les principales interactions sont résumées dans la Figure 30.



Figure 31 : Structure de FoxD3

FHD = Forkhead domain. Le motif de répression de la transcription est indiqué en rouge. (d'après Thomas et Erickson, 2009)

La fonction de *FoxD3* a particulièrement été étudiée chez le poulet, la caille et le poisson zèbre. Chez l'oiseau, il apparaît non seulement que l'expression de *Mitf* et celle de *FoxD3* sont mutuellement exclusives, mais aussi que l'activation de *Mitf* a lieu après l'extinction de *FoxD3* (Kos *et al.*, 2001; Krispin *et al.*, 2010).

L'extinction de *FoxD3* dans les CCN de poulet aboutit à une augmentation du nombre de mélanocytes empruntant la voie dorsolatérale alors que sa surexpression empêche les CCN d'emprunter cette voie (Kos *et al.*, 2001). De plus, chez la caille, l'extinction de *FoxD3* dans des cultures de CCN aboutit à une augmentation significative de la proportion de mélanocytes (Kos *et al.*, 2001). Il a par la suite été montré chez le poisson zèbre et le poulet que *FoxD3* agit en réprimant l'expression de *Mitf* dans les phases précoces du développement des CN (Ignatius *et al.*, 2008; Thomas et Erickson, 2009). Cette répression se fait indirectement en interagissant avec PAX3 pour empêcher ce dernier d'activer *Mitf*. En revanche, chez le poisson-zèbre, *foxd3* réprime directement l'expression de *mitfa*, l'orthologue de *Mitf*, en se fixant sur son promoteur (Curran *et al.*, 2009; Ignatius *et al.*, 2008).

Le rôle de *FoxD3* chez les mammifères est difficile à étudier car, en plus de son implication dans le développement des CN, *FoxD3* est indispensable au développement précoce de l'embryon dans ces espèces. En effet, les souris mutantes invalidées pour *FoxD3* ne développent pas de ligne primitive, ne subissent pas de gastrulation ni ne développent de mésoderme (Hanna *et al.*, 2002). En générant des souris *Foxd3^{fllox/-}*; *Wnt1-Cre*, Teng et ses collaborateurs ont pu invalider *Foxd3* spécifiquement dans les CN. Les embryons obtenus meurent à la naissance et présentent des anomalies sévères traduisant une absence de nombreux dérivés des CN : malformations de la face, ganglions rachidiens de taille réduite, absence de système nerveux entérique (Teng *et al.*, 2008). Le développement du lignage mélanocytaire a néanmoins pu être étudié et il apparaît que l'invalidation de *Foxd3* entraîne une différenciation ectopique des CCN en mélanocytes dans les ganglions rachidiens aux dépens de la différenciation neuronale et gliale (Nitzan *et al.*, 2013a). De plus, l'examen des nerfs de mutants à E12,5 révèle la présence de nombreuses cellules exprimant *Mitf*, et donc interprétées comme appartenant au lignage mélanocytaire, le long de nerfs alors que chez les individus témoins, ces cellules sont moins nombreuses et leur distribution est limitée à l'extrémité de ces nerfs (Nitzan *et al.*, 2013b).

Foxd3 apparaît donc comme un antagoniste de *Mitf* qui favorise la destinée neuronale/gliale (Figure 32) et réprime la destinée mélanocytaire pour les CCN précoces mais aussi pour les PCS. A ce jour, les mécanismes qui régulent l'expression de *Foxd3* ne sont cependant pas élucidés.

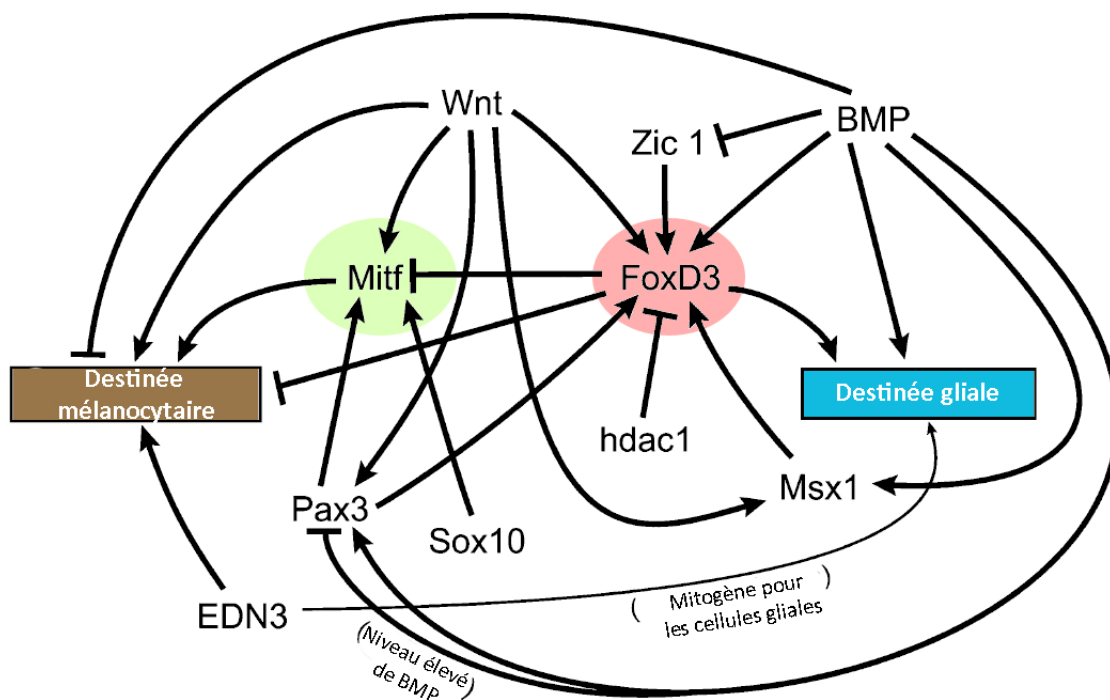


Figure 32 : Interactions contrôlant le choix entre destinée gliale et destinée mélanocytaire : rôle central de *Mitf* et *Foxd3*

Les expressions de *Mitf* et *Foxd3* sont mutuellement exclusives. Les principales interactions aboutissant à l'expression de l'un ou de l'autre sont ici représentées. Ce schéma synthétise des données issues de plusieurs espèces (oiseaux, poisson-zèbre, souris) et ne sont donc pas forcément toutes applicables à une espèce en particulier. Par exemple, la répression exercée par *hdac1* (histone déacétylase 1) sur *foxd3* a été mise en évidence chez le poisson-zèbre (d'après Thomas et Erickson, 2008).

E - Facteurs impliqués dans la détermination des mélanoblastes à partir des PCS

La découverte d'une origine par la voie ventrale des mélanoblastes est encore trop récente pour que les mécanismes impliqués dans la détermination des mélanoblastes à partir des PCS soient élucidés. Comme nous l'avons vu, *Foxd3* joue un rôle déterminant dans le choix entre destinée gliale ou mélanocytaire. D'autres facteurs de transcription et voies de signalisations ont été identifiées comme pouvant jouer un rôle dans cette spécification, comme la voie Notch, *SOX10* (Figure 33) (Ernfors, 2010).

Le couple Neuréguline 1/*ErbB2* apparaît également crucial. La neuréguline 1 (*NRG1*) est un ligand Epidermal Growth Factor-like (EGF-like) pour le récepteur à activité tyrosine kinase hétérodimérique *ErbB2*/*ErbB3* exprimée par les cellules de Schwann et leurs précurseurs (Burden et Yarden, 1997). La *NRG1* est produite par les neurones sensitifs et moteurs et s'insèrent sur la membrane de l'axone (Birmingham-McDonogh *et al.*, 1997). Elle s'accumule dans les nerfs au moment où les PCS les colonisent. Une fois dans les nerfs, les PCS ont besoin du signal *NRG1* pour survivre (Jessen et Mirsky, 2005). Les travaux d'Adameyko ont montré que *NRG1* réprime la destinée mélanocytaire à partir des PCS à la fois *in vitro* et *in vivo* (Adameyko *et al.*, 2009). Chez les souris invalidées pour *ErbB3*, on observe ainsi une augmentation du nombre de mélanoblastes le long des

nerfs avec une diminution parallèle du nombre de PCS. De même, des mélanoblastes sont observés au sein et autour des nerfs après axonotomie. Le signal NRG1 intervient donc dans la balance entre destinée gliale ou mélanocytaire. Pour expliquer la détermination des mélanoblastes par la voie ventrale, les auteurs proposent que les PCS se multipliant rapidement finissent par entrer en compétition pour la NRG1 à la surface des axones et que ceux qui ne parviennent plus à recevoir le signal meurent par apoptose ou sont déterminés en mélanoblastes (Ernfors, 2010).

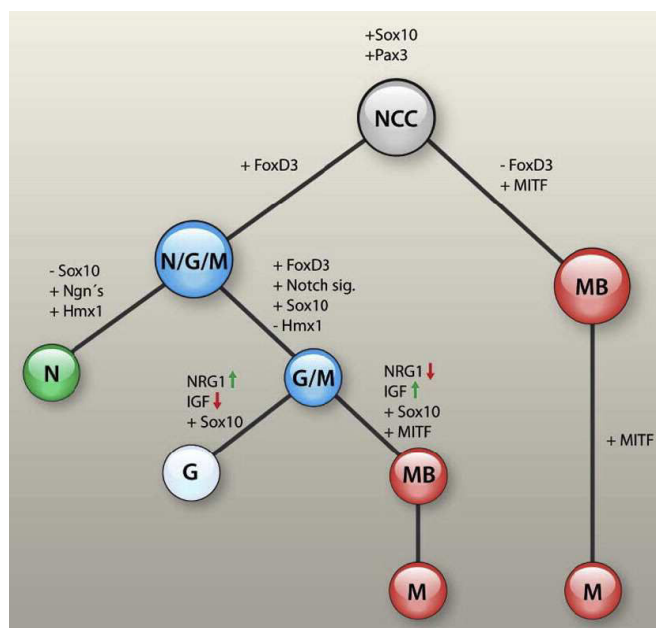


Figure 33 : Facteurs de transcription et facteurs solubles impliqués dans diversification des CCN

Modèle hiérarchique de spécification des différents types cellulaires issus des CCN troncales. Le signe « + » indique l'expression d'un facteur de transcription, le signe « - » sa perte d'expression. Le schéma indique également le rôle des signaux solubles NRG1 et IGF dans l'engagement vers la destinée gliale ou mélanocytaire.

NCC : Cellule de crêtes neurales ; N/G/M : Progéniteur de neurones, cellules gliales et de mélanoblastes ; G/M : Progéniteur de cellules gliales et de mélanoblastes ; N : Cellule neuronale engagée ; G : Cellule gliale ; MB : Mélano-blaste ; M : Mélano-cyte. (Ernfors, 2010)

Le facteur de transcription SOX2 est une autre piste intéressante. En effet, SOX2 réprime directement l'expression de *Mitf* et il doit être éteint avant que les mélanoblastes soient déterminés à partir des PCS (Adameyko *et al.*, 2012). Le fait que son expression décroisse le long des trajets nerveux pourrait expliquer que les mélanoblastes dérivés des PCS aient été observés principalement aux extrémités des nerfs.

F - Plasticité des mélanocytes et des cellules de Schwann

Même après leur détermination, et malgré la présence de signes de différenciation évidents comme la synthèse de pigment, le phénotype des mélanocytes n'est pas complètement stable. Dans

des conditions expérimentales, il est en effet possible d'observer une **plasticité** des mélanocytes, c'est-à-dire un changement de phénotype sous l'influence d'un changement dans leur environnement.

On a ainsi pu observer que si des NCC de souris sont mises en culture, alors qu'elles expriment des marqueurs de mélanoblaste (*Dct*, *Kit*, *Mitf*) après 4 jours de culture, seules 1-2% d'entre elles se différencieront en mélanocytes au bout de 2 semaines (Dunn *et al.*, 2005). Des mélanocytes de caille isolés à partir de l'épiderme et mis en culture répriment, après plusieurs jours, l'expression de gènes spécifiques du lignage mélanocytaire et certains d'entre eux se différencieront en d'autres dérivés de NC (Dupin *et al.*, 2000; Real *et al.*, 2006; Richardson et Sieber-Blum, 1993).

Ce retournement phénotypique est exacerbé et accéléré en présence d'endothéline 3 (Edn3) dans le milieu de culture (Dupin *et al.*, 2000; Real *et al.*, 2006)(Figure 34). L'effet n'est cependant pas unidirectionnel. En effet, des cellules de Schwann d'embryons de caille isolées et mises en culture en présence d'Edn3 se dédifférencient également en précurseurs bipotents pour ensuite se différencier en mélanocytes (Dupin *et al.*, 2003; Real *et al.*, 2005). De plus, après plusieurs jours de culture en présence d'Edn3, des mélanocytes de caille commencent à adopter un profil d'expression génétique typique de NCC multipotentes précoces (Real *et al.*, 2006). Il apparaît donc que l'Edn3 entraîne une dédifférenciation à la fois des mélanocytes et des cellules de Schwann en précurseurs bipotents. Si les facteurs conduisant à une redifférenciation vers l'un ou l'autre des lignages en présence d'Edn3 ne sont cependant pas connus à l'heure actuelle, il est intéressant de constater que, bien que parfaitement différenciés, mélanocytes et cellules de Schwann conservent la capacité de revenir à un phénotype immature, du moins dans des conditions expérimentales. Il existe cependant des désaccords, tenant probablement aux conditions expérimentales, quant à la durée pendant laquelle cette plasticité est permise. Alors que Richardson constate que les mélanocytes épidermiques de la caille sont complètement engagés à E6, Dupin et Real observent une plasticité persistante à E7,5 (Dupin *et al.*, 2000; Real *et al.*, 2006; Richardson et Sieber-Blum, 1993).

En dehors du développement des mélanocytes, la capacité des nerfs à produire des cellules pigmentées a déjà été observée en période post-natale. *In vitro*, des cellules de Schwann ou des SCP peuvent produire des cellules pigmentées en passant par un stade cellules progénitrices gliales/mélanocytaires (Dupin *et al.*, 2003; Sherman *et al.*, 1993).

In vivo, il a par ailleurs été observé chez la souris, après section puis suture du nerf sciatique, une hyperpigmentation au site de coupure. L'origine de cette pigmentation a été attribuée à des cellules provenant du nerf lui-même car des fragments de nerfs greffés chez des souris albinos, qui ne peuvent produire de pigments, présentaient toujours cette pigmentation (Rizvi *et al.*, 2002). La nature exacte des cellules à l'origine de la pigmentation reste encore difficile à déterminer précisément. Plusieurs hypothèses sont en effet possibles : s'agit-il de cellules de Schwann s'étant dé-différenciée ? Ou bien de progéniteurs ou de cellules-souches bipotents, voire multipotents, présents dans les nerfs ? Cette dernière hypothèse est compatible avec la description, chez la souris, de cellules ayant des

propriétés de cellules souches de CN et associées aux terminaisons nerveuses entourant les follicules pileux (Wong *et al.*, 2006).

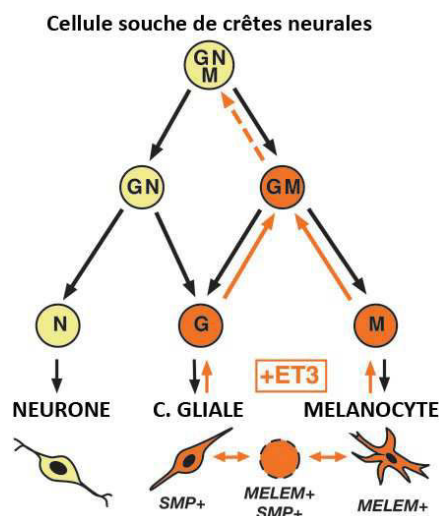


Figure 34 : Effets de l'endothéline 3 sur la plasticité des mélanocytes et des cellules gliales chez la caille

Modèle proposé par Dupin 2003 à partir de travaux menés sur les embryons de caille. La différenciation des mélanocytes et des cellules gliales (cellules de Schwann) résulte de restrictions progressives impliquant un intermédiaire bipotent de précurseur de cellules gliales/mélanocytaires (GM) qui n'a cependant pas été complètement identifié. Sous l'action de l'endothéline 3, cellules gliales et mélanocytes prolifèrent et retournent à un état de précurseur GM. La conversion des mélanocytes en cellules gliales, et inversement, passe par un type cellulaire transitoire exprimant des gènes spécifiques des deux lignages (ici SMP et MeLEM). GNM : Précurseur pluripotent de cellules gliales, de neurones et de mélanocytes ; GN : Précurseur bipotent de cellules gliales et de neurones ; ET3 : Endothéline 3 ; SMP : Schwann cell Myelin Protein ; MeLEM : Melanoblast/mélanocyte Early Marker

III - TROUBLES DE L'HOMÉOSTASIE DU LIGNAGE MELANOCYTAIRE

A l'échelle d'une population cellulaire, on peut définir l'homéostasie comme un équilibre entre mort cellulaire et prolifération, dans le but de maintenir un nombre constant de cellules afin de s'adapter aux changements internes ou externes. Les deux lignées de souris transgéniques qui ont été étudiées au cours de ce travail de thèse montrent des anomalies de l'homéostasie dans le lignage mélanocytaire, l'une par un excès de prolifération cellulaire conduisant au développement de mélanomes (souris *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}*), l'autre par un défaut de maintien de la population mélanocytaire (souris *Tg(Dct::Sbno2)*). Nous proposons donc ici de présenter ces deux aspects.

A - Le mélanome : quand la prolifération des mélanocytes n'est plus contrôlée

Les proliférations mélanocytaires tumorales peuvent être classées en deux grandes catégories : les tumeurs mélanocytaires bénignes et les tumeurs mélanocytaires malignes. Chez l'homme, les tumeurs mélanocytaires bénignes sont communément appelées **naevi mélanocytaires** (« grains de

beauté »), ou plus simplement naevi¹ (Eggermont *et al.*, 2013) alors que chez les animaux, le terme de **mélanocytome** est plus couramment utilisé (Smith *et al.*, 2002). Les tumeurs mélanocytaires malignes sont appelées **mélanomes** (mélanome malin, *malignant melanoma*). Bien que les tumeurs mélanocytaires proviennent généralement des mélanocytes cutanés, elles peuvent aussi se développer primitivement dans d'autres organes (œil, système nerveux central, cavité buccale) (Bastian, 2014; Eggermont *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2002). Nous ne nous intéresserons ici qu'au mélanome cutané.

1) Le mélanome cutané de l'homme : une maladie complexe et polymorphe

❖ Epidémiologie

Chez l'homme, les mélanomes cutanés sont des cancers agressifs à haut pouvoir métastatique. Leur incidence est toujours en augmentation malgré des politiques de sensibilisation et de prévention (Larue et Beermann, 2007). En France, l'incidence en 2011 était d'environ 10 000 nouveaux cas par an. Le mélanome cutané se situe au 9^{ème} rang des cancers, tous sexes confondus, et occupe le 16^{ème} rang des décès par cancer (chiffres de l'Institut National du Cancer : www.e-cancer.fr/).

L'exposition aux rayons ultra-violet, notamment les UV-B, joue un rôle essentiel dans la pathogénie des mélanomes cutanés en favorisant les mutations. L'augmentation de l'incidence des mélanomes cutanés s'expliquerait par des comportements favorisant l'exposition intense, intermittente, répétée, aux UV d'origine solaire chez des personnes à la peau blanche et peu pigmentée (Eggermont *et al.*, 2013). Le risque de développer un mélanome cutané est aussi lié à des facteurs génétiques. Environ 10% des mélanomes cutanés ont une prédisposition familiale avec au moins 2 parents proches atteints. On peut également dresser un portrait du patient type atteint de mélanome : il s'agit d'une personne à la peau blanche et pale, aux cheveux blonds ou roux, et aux yeux bleus (Eggermont *et al.*, 2013). Ces caractéristiques suggèrent que des gènes comme *MC1R*, dont le rôle dans la pigmentation de la peau et la détermination du phototype cutané est majeur, interagissent avec l'environnement, et particulièrement l'exposition solaire, pour augmenter le risque de mélanomes (Raimondi *et al.*, 2008).

Parmi les gènes associés à un risque élevé de développer un mélanome, figure *CDKN2A* (Goldstein *et al.*, 2007). Ce gène produit, après épissage alternatif, deux protéines suppresseurs de tumeurs, p16^{INK4a} et p14^{ARF}, qui lorsqu'elles sont mutées, favorisent la prolifération cellulaire par inhibition des protéines RB1 et p53 respectivement. Des mutations germinales de *CDKN2A* sont retrouvées dans environ 30% des cas de mélanomes familiaux (Tsao *et al.*, 2012).

¹ Le terme « naevus » employé seul est toutefois imprécis et ambigu car il renvoie à d'autres lésions non mélanocytaires, de nature malformative (naevus sébacé, naevus épidermique etc.).

La présence de nombreux naevi mélanocytaires, surtout s'ils sont de grande taille (plus de 6 mm de diamètre) et de morphologie atypique (bords et couleurs irréguliers) constitue également un facteur de risque. Ces naevi atypiques doivent conduire à une surveillance régulière des patients qui ont un risque accru de développer un mélanome (Clarke, 2011; Dediol *et al.*, 2011).

❖ **Caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des mélanomes cutanés**

Les mélanomes peuvent se développer à partir d'un naevus préexistant ou d'un naevus atypique, mais ils surviennent *de novo* dans la majorité des cas (Bevona *et al.*, 2003). Les mélanomes cutanés de l'homme ont pour caractéristique de présenter deux phases de croissances, plus ou moins évidentes selon les types. Initialement, on note une **phase de croissance horizontale ou radiale** (*radial growth phase*), débutant dans l'épiderme, avec une extension latérale sans envahissement du derme. A ce stade, les mélanocytes tumoraux n'ont donc traversé la lame basale : on parle de mélanome *in situ*. C'est la présence de mélanocytes de morphologie atypique qui permet alors de reconnaître la lésion comme un mélanome. Avec le temps débute une **phase de croissance verticale** dans laquelle les mélanocytes tumoraux envahissent le derme (Smoller, 2006). La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé reconnaît quatre grands types de mélanomes se distinguant les uns des autres par leur siège, leurs caractéristiques cliniques et morphologiques (Koh, 1991; Su, 1997) (Figure 35).

Le **mélanome superficiel extensif** (SSM = *Superficial Spreading Melanoma*) représente le type le plus fréquent dans la population caucasienne et compte pour 75% des nouveaux cas de mélanomes. Il siège typiquement au niveau du cou, du tronc et des extrémités, sans prédilection pour les zones exposées de façon chronique au soleil. Il est en revanche associé à des coups de soleil importants survenus dans le passé, particulièrement au cours de l'enfance et chez les personnes à la peau claire. Il connaît une phase de croissance horizontale d'environ 1 à 5 ans avant la phase de croissance verticale (Koh, 1991).

Le **mélanome de Dubreuilh** (*Lentigo Maligna Melanoma*) représente environ 5-10% des mélanomes. Il survient chez les sujets âgés avec une prédilection pour les zones exposées de façon chronique au soleil (visage, cou, mains) (Koh, 1991).

Le **mélanome acral lentigineux** (*Acral Lentiginous Melanoma*) survient au niveau de la paume des mains, de la plante des pieds ou du lit unguéal. Il n'est pas lié à l'exposition solaire. Rare chez les individus à la peau claire, il représente le type le plus fréquent dans les populations asiatiques, afro-américaines et hispaniques (Koh, 1991).

Le **mélanome nodulaire** (*Nodular Melanoma*) représente 4 à 18% des mélanomes cutanés. Il s'agit du type dont la croissance est la plus rapide. Sa phase de croissance horizontale passe généralement inaperçue et il se développe surtout dans le derme avec une composante épidermique

minime. Il peut survenir sur toutes les parties du corps mais survient plus fréquemment sur la tête, le cuir chevelu, le cou et le tronc (Koh, 1991).



Figure 35 : Principaux types de mélanomes

A : Mélanome superficiel extensif ; **B** : Mélanome de Dubreuilh ; **C** : Mélanome acral lentigineux ; **D** : Mélanome nodulaire (Eggermont *et al.*, 2013)

Le diagnostic de mélanome passe d'abord par un examen dermatologique attentif afin notamment de détecter les lésions le plus précocement possible. La méthode **ABCDE** permet de repérer des lésions suspectes en recherchant 5 paramètres associés au mélanome : une asymétrie de la lésion (**A**), des bords irréguliers (**B**), une couleur hétérogène (**C**), un diamètre supérieur à 6 mm (**D**) et une évolution rapide (**E**) (Abbasi *et al.*, 2004). Le diagnostic définitif est apporté par un examen histopathologique à partir d'une biopsie : il permet de visualiser les mélanocytes tumoraux qui forment généralement de petites thèques dans l'épiderme avant d'envahir le derme (Smoller, 2006) (Figure 36). Le diagnostic histopathologique de mélanome peut s'avérer difficile et il peut être nécessaire de recourir à des techniques complémentaires comme des marquages immunohistochimiques, afin de rechercher des antigènes exprimés dans les mélanomes (HMB-45, tyrosinase, Melan-A, MITF-M, S100) (Mooi et Krausz, 2007). L'examen histopathologique permet par ailleurs de fournir des éléments pronostiques comme l'indice de Breslow. Cet indice, établi par l'anatomopathologiste américain Alexander Breslow, est un score correspondant à l'épaisseur maximale exprimée en millimètre d'un mélanome cutané, depuis la partie la plus superficielle jusqu'à la partie la plus profonde. Ce score reflète donc la phase de croissance verticale. Il est fortement corrélé au taux de survie à 5 ans avec 96% de survie pour un score inférieur à 0,75 mm contre 44% de survie pour un score supérieur à 4 mm (Breslow, 1970).

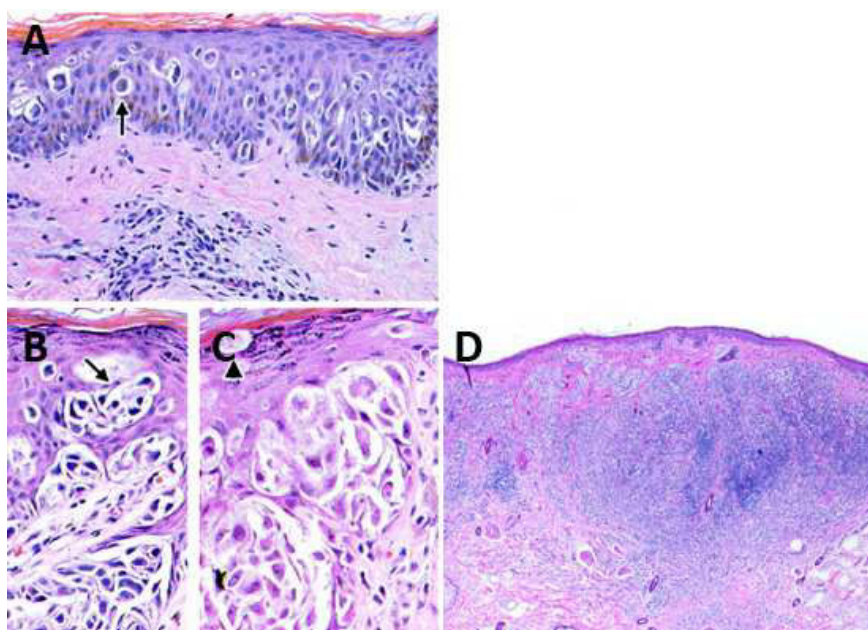


Figure 36 : Caractéristiques histopathologiques d'un mélanome superficiel extensif humain

A : Mélanome *in situ* précoce avec prolifération strictement épidermique de mélanocytes atypiques éparés (flèche) ; **B et C :** Mélanome *in situ* avancé avec formations de thèques intraépidermiques regroupant plusieurs mélanocytes (flèches). La prolifération est toujours dans l'épiderme et n'a pas franchi la lame basale. **D :** Mélanome superficiel extensif invasif, avec phase de croissance verticale. La prolifération a franchi la lame basale et infiltre massivement le derme (Recio et al., 2002).

❖ Caractéristiques génétiques des mélanomes humains

Le mélanome est une maladie complexe et hétérogène du point de vue génétique. L'étude des mutations associées au mélanome a permis de mieux comprendre la pathogénie de la maladie, d'en affiner la classification et d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques avec des thérapies ciblées. Plusieurs voies de signalisation ont ainsi pu être identifiées comme cruciales dans le développement de la maladie (Figure 37). Les anomalies génétiques les plus fréquemment rencontrées concernent : des **oncogènes** comme *BRAF* (50-70% des cas), *NRAS* (15-30% des cas) ; gènes **suppresseurs de tumeurs** comme *CDKN2A* (30-70% des cas), *PTEN* (5-20% des cas), *APAF-1* (40% des cas), *p53* (10% des cas) ; ou **d'autres catégories de gènes** comme *MITF* (10-16% des cas) (Gray-Schopfer et al., 2007).

La fréquence des altérations génétiques est différente selon les types de mélanomes cutanés et il est ainsi possible de définir des profils signatures. La mutation *BRAF*^{V600E} est ainsi l'anomalie prédominante dans les SSM. Elle est également retrouvée avec une fréquence proche dans les mélanomes nodulaires. Ces derniers montrent par ailleurs des mutations dans *NRAS* dans 27% des cas (J.-H. Lee et al., 2011). Le mélanome de Dubreuilh présente lui une signature très différente avec une prédominance de mutation de *p53* (50% des cas) ainsi que des mutations dans *KIT* qui, bien que rares (2% des cas), ne sont pas retrouvées dans les SSM (Curtin et al., 2006; Hocker et Tsao, 2007). Les mutations de *KIT* sont en revanche relativement fréquentes dans le mélanome acral lentigineux (17%

des cas) alors que les mutations de *BRAF* y sont plus rares que dans les SSM (25% des cas) (Curtin *et al.*, 2006; J.-H. Lee *et al.*, 2011). Ces différents profils génétiques sont à prendre en compte lorsqu'il est question de produire des modèles transgéniques de mélanome humain.

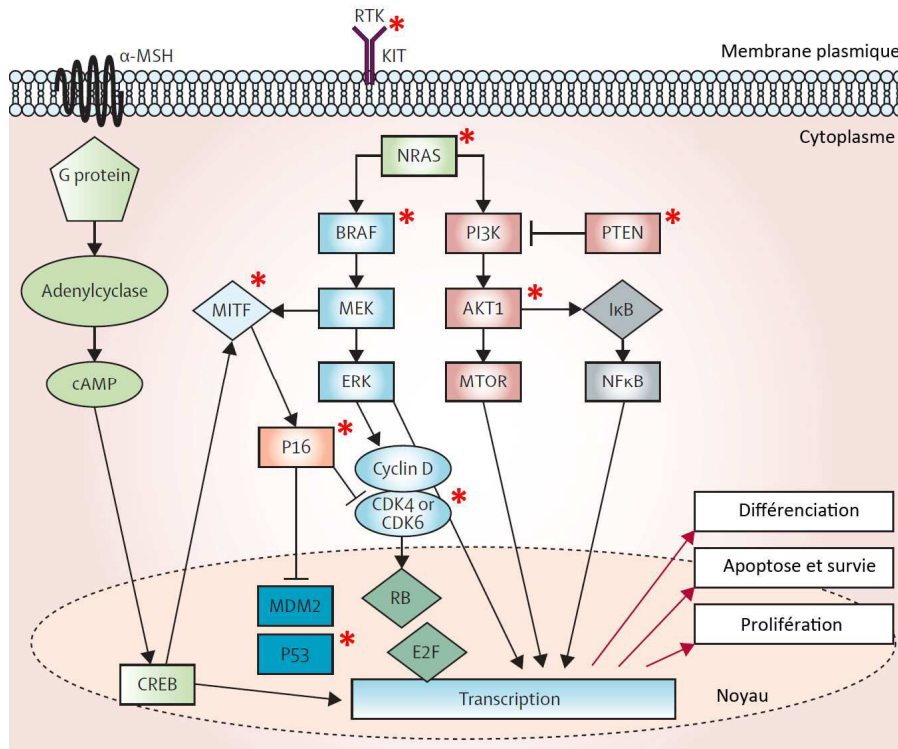


Figure 37 : Voies de signalisation impliquées dans le mélanome chez l'homme

Les étoiles indiquent les principales cibles de mutations dans les mélanomes humains (Eggermont *et al.*, 2013)

2) Modèles animaux de mélanome

❖ Les mélanomes animaux sont différents des mélanomes humains

Des tumeurs mélanocytaires, dont les mélanomes, se développent spontanément dans plusieurs espèces. En médecine vétérinaire, les mélanomes du chien et du cheval sont des tumeurs relativement fréquentes. Ces tumeurs présentent néanmoins des caractéristiques qui les distinguent de leurs homologues humains. Par exemple, les mélanomes du chien **1)** sont majoritairement buccaux et non cutanés **2)** ne sont pas liés à une exposition aux UV, **3)** se développent préférentiellement sur des animaux à la peau fortement pigmentée, **4)** ne ressemblent pas morphologiquement aux types les plus fréquents de mélanomes cutanés humains (Gillard *et al.*, 2013).

L'impact sur la santé publique que représente le mélanome a conduit les chercheurs à développer des modèles animaux permettant à la fois d'étudier les mécanismes pathogéniques de la maladie mais aussi d'explorer de nouvelles approches thérapeutiques. Plusieurs espèces ont été

utilisées comme modèle de mélanome : chevaux gris camarguais, porcs sinclair et MeLim, poissons *Xiphophorus*, opossums *Monodelphis domestica*, cobayes et Hamsters (Ha *et al.*, 2005; Jhappan *et al.*, 2003; Vincent-Naulleau *et al.*, 2004; Walter et Kazianis, 2001). Le modèle idéal doit pouvoir récapituler toutes les caractéristiques du mélanome cutané humain : induction par les UV, caractéristiques génétiques et moléculaires, caractéristiques cliniques et histopathologiques (Ha *et al.*, 2005). Force est de constater que ces modèles de mélanomes ne répondent que rarement à toutes ces exigences, et particulièrement en ce qui concerne la reproduction des caractéristiques histopathologiques (Ha *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2011). En effet, alors que les mélanomes cutanés humains se développent à partir de l'épiderme, les mélanomes cutanés animaux se développent généralement dans le derme, et ce probablement en raison d'une distribution distincte entre les mélanocytes de la peau humaine et ceux de la peau des autres espèces (Voir Les mélanocytes : cellules pigmentaires de la peau, page 3) (Ha *et al.*, 2005).

❖ Modèles murins de mélanomes : vers un modèle idéal ?

Bien que les espèces qui développent spontanément des mélanomes, comme le chien ou le cheval, soient intéressantes en termes de pathologie comparée, elles sont difficiles à valoriser en tant que modèle car elles nécessitent des coûts logistiques incompatibles avec la recherche biomédicale. Par ailleurs, ces espèces ne sont pas facilement manipulables génétiquement (Walker *et al.*, 2011).

A l'inverse, la souris est une espèce très utilisée en recherche biomédicale, et facilement manipulable génétiquement. On compte actuellement plus de 60 descriptions de modèles murins de mélanomes (Damsky et Bosenberg, 2010). L'obtention de ces modèles n'a pas été aisée car les mélanomes spontanés sont extrêmement rares et difficiles à induire dans cette espèce. Les premiers modèles murins de mélanome étaient donc des cultures cellulaires obtenues à partir de mélanomes sporadiques de souris (Harding et Passey, 1930). Parmi ces lignées, figure la ligne de cellules de mélanome B16, encore utilisée de nos jours (Fidler, 1973; Overwijk et Restifo, 2001; Roscoe B. Jackson Memorial Laboratory., 1962). Dans les années 1980, ont été développés les premiers modèles de mélanomes induits par des carcinogènes physiques ou chimiques, notamment par des UV ou par le DMBA (7,12-Diméthylbenz(a)anthracène) (Walker *et al.*, 2011). Dans les années 1990, sont apparus les premiers modèles de souris génétiquement modifiées (Iwamoto *et al.*, 1991). Tous ces modèles ne produisaient que des mélanomes non métastatiques. Aujourd'hui, les modèles transgéniques développés réussissent à produire des métastases et cherchent à récapituler le plus fidèlement possible les mélanomes humains en exprimant les mutations qui leur sont le plus souvent associées (Figure 37). Ils peuvent ainsi constituer des modèles d'études pré-cliniques pour de nouvelles thérapies (Ackermann *et al.*, 2005; Dankort *et al.*, 2009; Dhomen *et al.*, 2009).

La manipulation génétique des souris a également permis de contourner la difficulté de reproduire des mélanomes à point de départ épidermique. Pour ce faire, des cytokines comme le SCF (ligand de KIT) ou l'HGF/SF (ligand de c-Met), dont les récepteurs sont exprimés par les mélanocytes, sont surexprimées par les kératinocytes épidermiques. Il en résulte une « translocation » des mélanocytes dans l'épiderme qui aboutit à « l'humanisation » de la peau (Kunisada *et al.*, 1998). De telles stratégies ont permis de développer des modèles de mélanomes mimant davantage la phase de croissance horizontale des mélanomes humains. Ces modèles ne parviennent cependant pas tous à en reproduire le pouvoir métastatique (Damsky et Bosenberg, 2010; Landsberg *et al.*, 2010; Noonan *et al.*, 2001).

❖ **La lignée de souris transgénique *Tyr::NRAS^{Q61K}* ; *Ink4a*^{-/-} comme modèle de mélanome métastatique**

Trois gènes *RAS* existent chez les mammifères : *HRAS*, *KRAS* et *NRAS*. Ces gènes codent des protéines GTPases activées par les récepteurs membranaires de facteurs de croissance. La forme active de la protéine est couplée au GTP alors que sa forme inactive est couplée au GDP. En activant des kinases, les protéines RAS agissent sur plusieurs voies métaboliques, notamment celles de PI3K et BRAF, et régulent ainsi la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Goitre *et al.*, 2014). Des mutations *RAS* sont retrouvées dans plusieurs cancers humains et dans 25% des mélanomes. Dans ce dernier cas, il s'agit très majoritairement de mutations dans *NRAS* (22%) qui conduisent à la substitution, en position 61, d'une glycine (G) par une lysine (K) (*NRAS^{G61K}*). Il en résulte une protéine constitutionnellement active (Eskandarpour *et al.*, 2003).

Le modèle murin de mélanome produit par Ackermann et ses collaborateurs repose sur ces constatations. Dans ce modèle, les souris transgéniques sont porteuses de l'oncogène *NRAS^{Q61K}* placé sous contrôle du promoteur de la tyrosinase afin de limiter son expression au lignage mélanocytaire (Ackermann *et al.*, 2005). Ces souris développent spontanément des mélanomes pigmentés, souvent ulcérés et multiples mais avec une incidence faible (29%) et une latence de plus d'un an. Par ailleurs, les mélanomes produits ne métastasent pas. Ces animaux ont donc été passés sur un fonds génétique *Ink4a*^{-/-} (*Cdkn2a*^{-/-}) déficient pour les protéines suppresseurs de tumeurs p16^{INK4a} et p19^{ARF} (Serrano *et al.*, 1996). Cette stratégie permet non seulement d'augmenter la pénétrance à 94% et de réduire la latence à 7 mois, mais elle aboutit également à la formation de métastases, principalement dans les nœuds lymphatiques satellites, le foie et les poumons (Ackermann *et al.*, 2005).

Cette lignée de souris transgéniques, *Tyr::NRAS^{Q61K}* ; *Ink4a*^{-/-}, constitue l'une des deux lignées de souris transgéniques que nous avons étudiées et dont nous avons cherché à décrire le phénotype.

B - Le blanchiment du pelage : un défaut de maintien de la population de CSM

1) Les CSM résident dans le bulge

Chez l'adulte, les cellules souches permettent la génération et le maintien d'un ou de plusieurs lignages cellulaire, et ce tout au long de la vie d'un organisme. Ces caractéristiques sont dues à deux propriétés fondamentales : les cellules souches sont capables de s'auto-renouveler et elles donnent des cellules spécialisées après différenciation (Watt *et al.*, 2006). Les cellules souches sont localisées dans une niche, c'est-à-dire un microenvironnement particulier qui régule leur destinée.

Dans la peau, les mélanocytes matures de la matrice du follicule pileux meurent par apoptose à la fin de chaque cycle pileux (Tobin *et al.*, 1998). Au cours du cycle suivant, le renouvellement de cette population est permis par les CSM qui produisent alors de nouveaux mélanocytes tout en maintenant un pool de cellules souches pour les autres cycles. Chez la souris, les CSM ont été découvertes par Nishimura après injection de l'anticorps anti-c-kit ACK2 à des souriceaux de souche C57BL/6. L'injection avait pour conséquence d'entraîner une pousse de poils blancs associée à une diminution du nombre de mélanocytes différenciés. Seules quelques cellules exprimant *Dct* étaient encore présentes dans la région inférieure de la partie permanente du follicule pileux. Lors des cycles pileux suivants, les poils étaient de nouveau pigmentés et comportaient un nombre normal de mélanocytes différenciés. C'est ainsi que les quelques cellules *Dct*⁺ maintenues après l'injection d'ACK2 ont été identifiées comme les CSM, et que la région inférieure de la partie permanente du follicule pileux, le bulge, a été reconnue comme leur niche (Nishimura *et al.*, 2002). Les CSM ont pour caractéristiques de ne pas être pigmentées et d'exprimer un nombre limité de gènes du lignage mélanocytaire : *Dct*, *Sox10* et *Pax3* (Harris *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2005; Osawa *et al.*, 2005).

Plusieurs gènes ont été identifiés comme jouant un rôle dans le maintien des CSM. Des mutations dans ces gènes se traduisent par un phénotype de blanchiment précoce du pelage car il n'y a alors plus de cellules souches capables d'assurer le renouvellement de la population mélanocytaire du bulbe (Schouwey et Beermann, 2008).

2) La mutation patchwork affecte les CSM

La mutation récessive patchwork (*pwk*) est une mutation apparue spontanément dans un élevage de souris à San Francisco, sur un fonds génétique inconnu. Des souris homozygotes pour la mutation ont été introduites par Karen Moore dans l'animalerie du National Cancer Institute de Frederick, Maryland. Les souris *pwk/pwk* sont caractérisées par un pelage rouan, c'est-à-dire mélangeant des poils complètement pigmentés (noirs) et des poils totalement non pigmentés (blancs). Il n'y a pas de poils partiellement pigmentés (gris) (Aubin-Houzelstein *et al.*, 1998) (Figure 38). Chez les souris sauvages, on observe un blanchiment progressif du pelage avec l'âge. Ce vieillissement se

manifeste par l'apparition de poils gris puis blancs, ce qui traduit une déplétion progressive du stock de CSM dans le *bulge* (Nishimura *et al.*, 2005). Chez les souris *pwk/pwk*, on observe également un blanchiment progressif du pelage avec l'âge mais celui-ci ne se manifeste que par une augmentation du nombre de poils blancs, sans qu'il n'apparaisse jamais un poil gris. Ce phénotype est particulier aux souris *pwk/pwk*. Les souris *pwk/pwk* présente par ailleurs un allongement du tube digestif (dolichomégalie) (Aubin-Houzelstein *et al.*, 2003).



Figure 38 : Souris *pwk/pwk*
Photo : Jean-Jacques Panthier

3) *patchwork*, une mutation difficilement classable

Les mutations conduisant à une hypopigmentation chez la souris sont habituellement classées en trois catégories (Osawa, 2009) (Figure 39) :

- Des mutations dans des gènes impliqués dans le développement du lignage mélanocytaire (Ex : *Pax3*, *Sox10*, *Mitf*, *Kit*, *Kitl*, *Edn3*, *Ednrb*) : elles se traduisent par des taches blanches sur le pelage, correspondant aux zones où les mélanoblastes n'ont pas réussi à migrer, proliférer et/ou survivre ;
- Des mutations dans des gènes impliqués dans la différenciation des mélanocytes (Ex : *Dct*, *Mcr1*, *Tyr*, *Tyrp1*) : elles sont caractérisées par un pelage hypo- ou dépigmenté de manière homogène dans lequel chaque poil a le même phénotype ;
- Des mutations dans des gènes impliqués dans le maintien de la population de cellules souches du bulge (Ex : *Bcl2*, *Notch1*, *Nocth2*, *RBP-J*, mutation *Mitf^{vit}*) : elles sont associées à un blanchiment précoce de la couleur du pelage en raison d'une déplétion anticipée de la population de CSM.

La mutation *patchwork* ne peut être classée dans l'un de ces catégories de mutations. Dans notre laboratoire, il a été démontré précédemment : 1) que la mutation *patchwork* agit sur les mélanoblastes et non leur environnement ; 2) qu'elle affecte la survie des mélanoblastes entre E17,5 et la naissance lorsque ceux-ci sont en nombre insuffisant, possiblement *via* un effet de communauté (Aubin-Houzelstein *et al.*, 1998). Le gène codé au locus *patchwork* doit donc être exprimé à E17,5, à un

moment où il est nécessaire à la survie des mélanoblastes. Par ailleurs, la mutation patchwork entraîne un défaut de colonisation des follicules pileux en formation par les mélanoblastes, affecte la formation et, de façon limitée, le maintien du pool de CSM, et perturbe la différenciation terminale des mélanoblastes en mélanocytes (Djian-Zaouche, 2008).

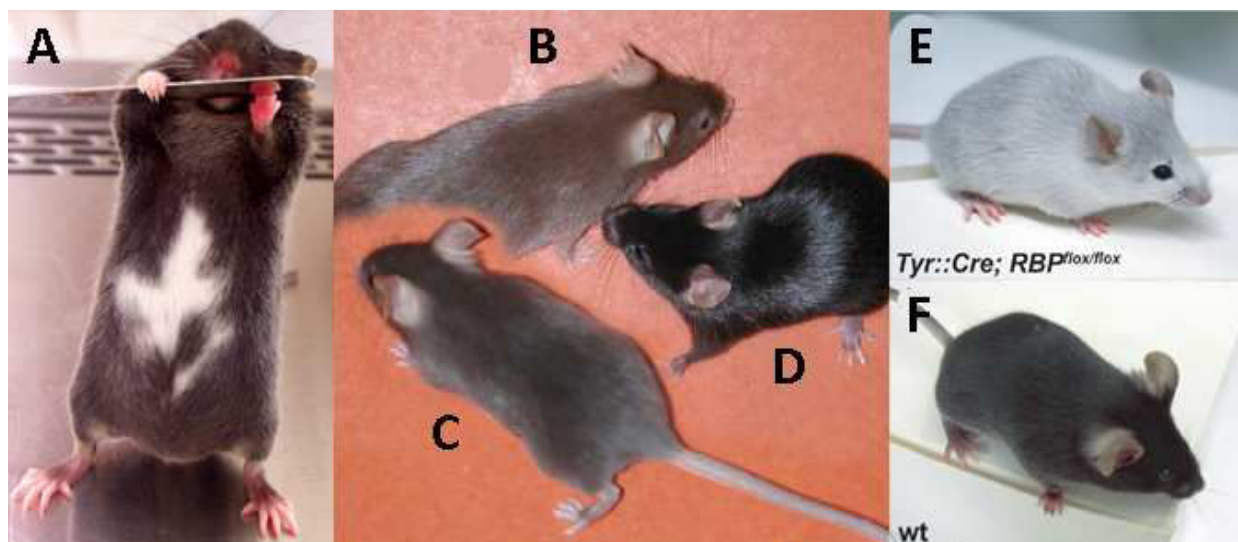


Figure 39 : Exemples de mutants de couleur du pelage chez la souris

A : Souris mutante hétérozygote $Sox10^{tm1Weg}/Sox10^+$ ($Sox10^{lacZ}$) : le ventre et les extrémités ne sont pas pigmentés traduisant une anomalie dans le développement des mélanocytes ; **B, C et D** : Souris $Tyrp1^b/Tyrp1^b$ (B), Dct^{slt}/Dct^{slt} (C) et souris C57BL/6J témoin (D) : chez les deux premières, le pelage présente une couleur diluée, traduisant une anomalie de la différenciation des mélanocytes (Bennett et Lamoreux, 2003) ; **E et F** : Souris $Tyr::Cre ; RBP^{flox/flox}$ (E) montrant un blanchiment précoce du pelage en comparaison avec la souris témoin (F). Ce phénotype traduit une anomalie dans le maintien de la population de CSM (Schouwey et Beermann, 2008).

Le locus *pwk* avait été cartographié sur le chromosome 10 de la souris par Karen Moore. Afin de cloner le gène au locus *patchwork*, une carte génétique à haute résolution et haute densité du locus *patchwork* a été établie à l'aide de marqueurs microsatellites. L'analyse a permis à notre laboratoire de localiser le locus *pwk* dans un intervalle de 0,33CM (Aubin-Houzelstein et Da Silva, résultats non publiés). Cet intervalle, homologue à la région 19p13.3 chez l'homme, correspond à un intervalle physique d'environ 1,47 Mb et contient 85 gènes. Une approche par gène candidat a permis d'identifier le gène *Strawberry Notch homolog 2* (*Sbno2*) comme le possible gène codé au locus *pwk* (Aubin-Houzelstein et Da Silva, résultats non publiés). Cette hypothèse découle de plusieurs observations : 1) *Sbno2* est exprimé dans les mélanoblastes et mélanocytes en culture ainsi que dans la peau fœtale à E17,5 ; 2) *Sbno2* est surexprimé dans la peau des souris *pwk/pwk* à E17,5 par rapport aux souris témoins. Cette hypothèse est par ailleurs renforcée par le fait que *Sbno2* est connu chez la drosophile comme un modificateur de la voie Notch et que cette voie elle-même impliquée dans le maintien des CSM.

4) La voie Notch est indispensable au maintien d'une population de CSM

La voie Notch est une cascade de signalisation conservée chez tous les métazoaires et qui a pour point de départ le récepteur membranaire Notch. Elle tient son nom du phénotype des drosophiles hétérozygotes pour des mutations de *Notch* dont les ailes étaient pourvues d'encoches caractéristiques (*notch* signifie encoche en anglais). Tous les récepteurs et ligands de la voie Notch sont des protéines transmembranaires, à un seul domaine transmembranaire, dont les domaines extracellulaires sont longs et constitués par la répétition de motifs EGF-like. Chez les mammifères, 4 récepteurs (Notch1, 2, 3 et 4) et 5 ligands (Jagged-1, Jagged-2, Delta-like 1, 2, et 3) sont décrits (Bray, 2006; Radtke *et al.*, 2005).

La fixation de Notch à son ligand induit deux clivages protéolytiques au sein du récepteur. Le premier clivage concerne le domaine extra-cellulaire et est initié par l'enzyme TACE (*Tumor necrosis factor- α -Converting Enzyme*). Il s'en suit un second clivage dans le domaine transmembranaire, médié par une γ -secrétase (Fortini, 2002). Le domaine intracellulaire de Notch, NICD (*Notch IntraCellular Domain*), est alors libéré et transloqué dans le noyau où il se lie au facteur de transcription CSL (appelé CBF1 chez l'homme et RBP-J κ chez la souris) et active la transcription des gènes cibles (Schouwey et Beermann, 2008) (Figure 40).

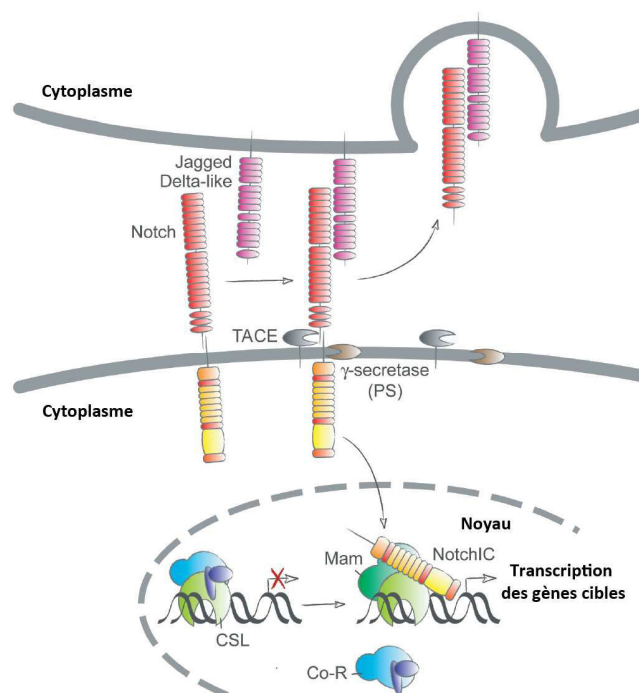


Figure 40 : La voie de signalisation Notch

La fixation du récepteur Notch à son ligand (Jagged ou Delta-like) induit deux clivages successifs qui aboutissent à la libération du domaine intracellulaire de Notch, NICD. Ce dernier est transloqué dans le noyau où il se fixe sur le facteur de transcription CSL et permet la transcription des gènes cibles (d'après Schouwey et Beermann, 2008).

La voie Notch est indispensable au développement et au maintien du lignage mélanocytaire. L'inactivation de *RBP-J κ* chez la souris est associée à un pelage présentant un mélange de poils pigmentés (noirs et gris) et de poils blancs. Dès le deuxième cycle pileux, le pelage devient presque

totalelement blanc en raison d'une disparition quasi-totale des cellules du lignage mélanocytaire, dont les CSM (Moriyama *et al.*, 2006). Un phénotype similaire est observé lors d'inactivation conditionnelle de *Notch1* et *Notch2* (Schouwey *et al.*, 2007). Il a été montré dans notre laboratoire que *Notch* limite la différenciation des CSM dans le *bulge*, ainsi que celle des mélanoblastes avant qu'ils n'atteignent le bulbe (Aubin-Houzelstein *et al.*, 2008).

5) *Sbno2*, gène candidat pour la mutation patchwork, a une fonction mal connue

Sbno2 a pour orthologue *sno* chez la drosophile. Le gène *sno* code une protéine qui relie les voies Notch et EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et interagit avec les gènes de la voie Notch (Coyle-Thompson et Banerjee, 1993; Tsuda *et al.*, 2002). La protéine codée par *sno* est un facteur de transcription conservé chez la drosophile, *Caenorhabditis elegans*, la souris et l'homme (Majumdar *et al.*, 1997). Entre la drosophile et l'homme, la séquence d'acide aminé de la protéine est identique à 75% et similaire à 88% sur 300 acides aminés (Figure 41)(Majumdar *et al.*, 1997). La protéine *Sbno2* de la souris présente quant à elle 55% d'identité avec la protéine *sno* de la drosophile (résultat non publié). Ces observations sont en faveur d'un rôle conservé de la protéine *Sbno2* chez les mammifères.

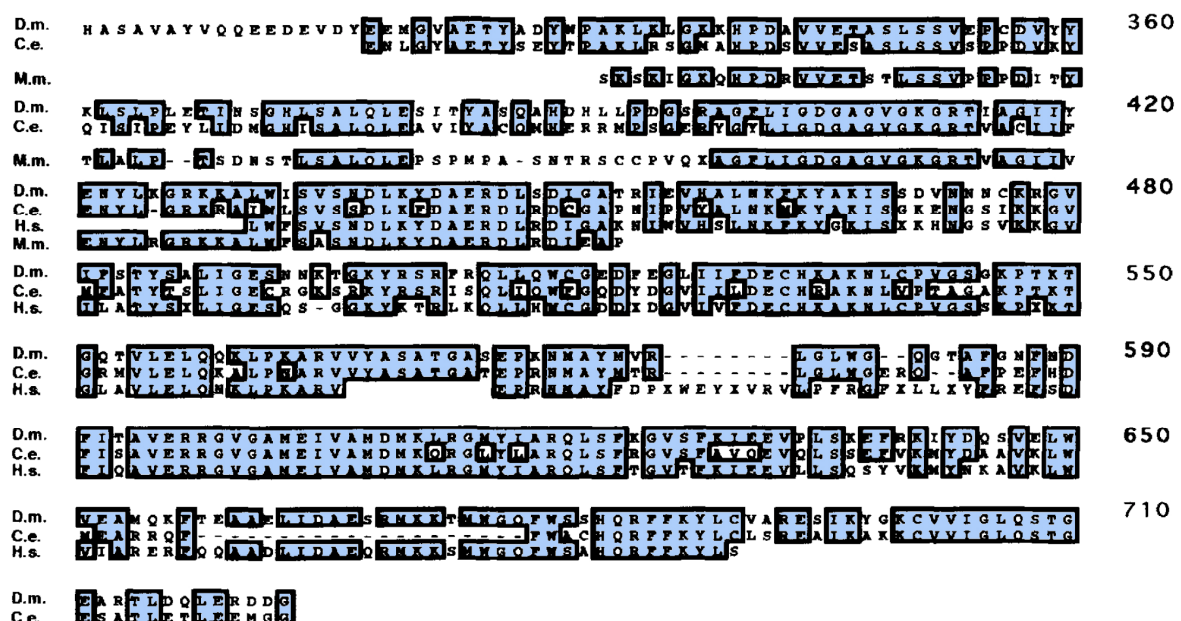


Figure 41 : Comparaison de la séquence de la protéine *sno* chez la drosophile avec les séquences chez *Caenorhabditis elegans*, chez l'homme et chez la souris

Le bloc représenté (résidus 300 à 722) correspond aux séquences présentant le plus d'alignement (en bleu) entre la drosophile (D.m.), *Caenorhabditis elegans* (C.e.), la souris (M.m.) et l'homme (H.s.) (d'après Majumdar *et al.*, 1997).

Chez la drosophile, les mutations de *sno* potentialisent les mutations de *Notch* et annulent les allèles hyperactifs de *Notch*. De plus, les mutations de *sno* et de *Notch* montrent des interactions

similaires avec les gènes de la voie Notch (Coyle-Thompson et Banerjee, 1993). Le phénotype des mutant *sno* est toutefois moins sévère que celui des mutants Notch. Chez la drosophile, la protéine *sno* intervient dans le développement de l'œuf, de l'œil, de l'aile et de la patte. L'étude du développement de l'œil a d'ailleurs pu montrer un lien entre les voies de signalisation EGFR et Notch avec un rôle de *sno* en amont de la voie Notch. En effet, suite à l'activation de la voie EGFR dans les photorécepteurs, *sno* lève la répression du gène *Delta*. Le ligand Delta est alors exprimé à la surface de la cellule et peut se lier au récepteur Notch de la cellule voisine pour agir sur sa destinée (Lai, 2002; Tsuda *et al.*, 2002). *sno* agit également en aval où elle interagit avec les co-activateurs nucléaires en aval de la voie Notch (Majumdar *et al.*, 1997).

Chez les mammifères, la fonction de *Sbno2* est mal connue et a été très peu étudiée. Il semble que *Sbno2* intervienne dans la fonction des macrophages. L'expression de *Sbno2* est stimulée dans les macrophages de souris et d'homme par l'interleukine 10 (IL-10), et il semble que *Sbno2* ait un rôle dans la réponse anti-inflammatoire médiée par IL-10 (El Kasmi *et al.*, 2007). Dans un modèle de septicémie, *Sbno2* apparaît surexprimé dans les cellules péritonéales de souris qui ont été inoculées avec *Escherichia coli* (Bhatty *et al.*, 2012). Très récemment, Maruyama et ses collaborateurs ont produit des souris dont les deux allèles de *Sbno2* ont été inactivés (*Sbno2*^{-/-}). Chez ces individus, l'inactivation de *Sbno2* est associée à un défaut de fusion des ostéoclastes, cellules responsables de la résorption de la matrice osseuse, et à des lésions d'ostéopétrose (Maruyama *et al.*, 2013).

Chez le poisson-zèbre, il existe trois homologues de *sno* : *sbno1*, *sbno2a* et *sbno2b*. Une étude d'expression de ces gènes a montré que leur expression, initialement ubiquitaire, était progressivement restreinte au système nerveux central (sauf pour *sbno2b* qui reste exprimé dans des tissus non nerveux). Ces observations suggèrent que les gènes *Sbno* jouent un rôle dans le développement du système nerveux central (Takano *et al.*, 2010).

Chez l'homme, *SBNO2* est voisin du gène *STK11* (*Serine/Threonine Kinase 11*) dont les mutations sont responsables du syndrome de Peutz-Jeghers. Pour cette raison, *SBNO2* a été retrouvé excisé chez certains patients présentant des délétions larges de *STK11*. Le phénotype des patients était cependant le même que lors de mutations conventionnelles ce qui conduit les auteurs à penser que l'haploinsuffisance vis-à-vis de *SBNO2* est sans conséquence (Resta *et al.*, 2010). Enfin, des études de protéomique sur cerveaux humains ont suggéré que *SBNO2* puisse jouer un rôle dans la schizophrénie (S.-A. Lee *et al.*, 2011).

IV - DES MALADIES REVELENT LES LIENS ENTRE MELANOCYTES ET CELLULES DE SCHWANN

Mélanocytes et cellules de Schwann ont une origine embryonnaire commune qui transparaît parfois encore chez l'adulte. On peut par exemple observer des cellules de Schwann possédant des mélanosomes et produisant de la mélanine dans la peau de l'homme et de rongeurs (Carbonell *et al.*, 1992; Garcia et Szabo, 1979). Cette parenté entre mélanocytes et cellules de Schwann resurgit également dans certains états pathologiques.

Bien que de nombreuses maladies ciblent sélectivement les mélanocytes ou les cellules de Schwann, il est en effet possible au cours de certaines d'entre elles d'observer une atteinte simultanée de ces deux lignages. Les exemples les plus frappants sont les tumeurs où l'on observe simultanément, quoique dans des proportions variables, une différenciation des cellules tumorales à la fois en mélanocytes et en cellules de Schwann. Ces observations sont généralement interprétées comme une dédifférenciation ou une transdifférenciation cellulaire. De telles maladies ont été particulièrement bien décrites chez l'homme et nous proposons dans cette partie d'en décrire trois exemples : le schwannome mélanotique, la neurofibromatose de type 1 et le mélanome desmoplastique. Pour certaines d'entre elles, des modèles de souris transgéniques ont été développés et récapitulent, plus ou moins bien, la maladie humaine.

A - Le schwannome mélanotique

Chez l'homme, le schwannome (anciennement neurilemmome) est une tumeur bénigne et encapsulée des nerfs périphériques, caractérisée sur le plan histologique par la présence de zones richement cellulaires et organisées (zones Antoni A) et de zones lâches myxoïdes² plus pauvres en cellules (zones Antoni B).

Le schwannome mélanotique (*melanotic schwannoma*), également appelé schwannome mélanocytaire, schwannome mélanotique psammomateux ou neurilemmome pigmenté, est une tumeur très rare considérée par certains auteurs comme un variant du schwannome conventionnel, par d'autres comme une entité nosologique distincte. Cette tumeur siège habituellement au niveau des ganglions paraspinaux en association avec les nerfs rachidiens ou autonomes mais d'autres localisations (cœur, bronches, foie, peau) ont également été rapportées (Carney, 1990; Weiss *et al.*, 2014). En fonction du degré de pigmentation, la tumeur apparaît macroscopiquement noire, brune, bleue ou grise.

² Le terme « myxoïde » décrit un tissu dont la morphologie rappelle, par sa teinte, son aspect et sa texture, le mucus.

Le schwannome mélanotique peut survenir de façon sporadique mais il est dans plus de la moitié des cas associé à un complexe de Carney (Carney, 1990). Cette maladie génétique de pénétrance et d'expressivité variables ségrège selon un mode de transmission autosomique dominant. Elle se caractérise par l'association (Carney, 1995; Carney *et al.*, 1986) :

- de myxomes³ cardiaques ;
- de proliférations mélanocytaires cutanées sous forme de lentigines, naevi bleus et naevi bleus épithélioïdes ;
- d'une hyperactivité endocrinienne se traduisant par une acromégalie, un syndrome de Cushing ou une maturité sexuelle précoce chez les individus masculins. Ces manifestations sont à lier respectivement au développement de tumeurs hypophysaires (adénome hypophysaire), surrénaliennes (dysplasie nodulaire pigmentée) ou testiculaire (tumeur calcifiée à grandes cellules de Sertoli).

On retrouve dans les schwannomes mélanotiques plusieurs caractéristiques histologiques des schwannomes conventionnels. Il s'agit de tumeurs généralement bien délimitées et encapsulées, composées de cellules fusiformes à contours flous rappelant un syncytium et pouvant contenir des pseudoinclusions nucléaires. Un certain degré d'alignements palissadiques des noyaux ou d'enroulements cellulaires en tourbillons, très typiques des tumeurs nerveuses, est parfois observé (Weiss *et al.*, 2014). En microscopie électronique, les cellules tumorales montrent des caractéristiques de cellules de Schwann comme la présence de prolongements cytoplasmiques et membranaires formant des interdigitations ou la production d'une lame basale (Weiss *et al.*, 2014). Les schwannomes mélanotiques, en particulier s'ils sont associés à un complexe de Carney, ont la particularité de produire des concrétions calcaires concentriques appelées psammomes (Carney, 1990).

La caractéristique principale du schwannome mélanotique reste la production de pigments de mélanine, parfois si intense qu'elle parvient à masquer les détails cytonucléaires (Figure 42). Les pigments peuvent être finement granuleux ou grossiers selon les champs et ont des propriétés tinctoriales similaires à celles de la mélanine cutanée. Ils sont en effet positifs à la coloration de Fontana-Masson mais négatifs pour la coloration de Perls (coloration du fer) et la coloration à l'Acide Periodique-Schiff. Ces caractéristiques les distinguent des pigments de neuromélanine parfois observés dans les schwannomes conventionnels. En microscopie électronique, on retrouve des prémélanosomes et des mélanosomes qui sont en faveur d'une synthèse des pigments par les cellules tumorales. En immunohistochimie, le schwannome mélanotique exprime fortement la protéine S100 et le (HMB-45) (Weiss *et al.*, 2014).

³ Tumeur conjonctive bénigne constituée de fibroblastes et d'un abondant stroma myxoïde.

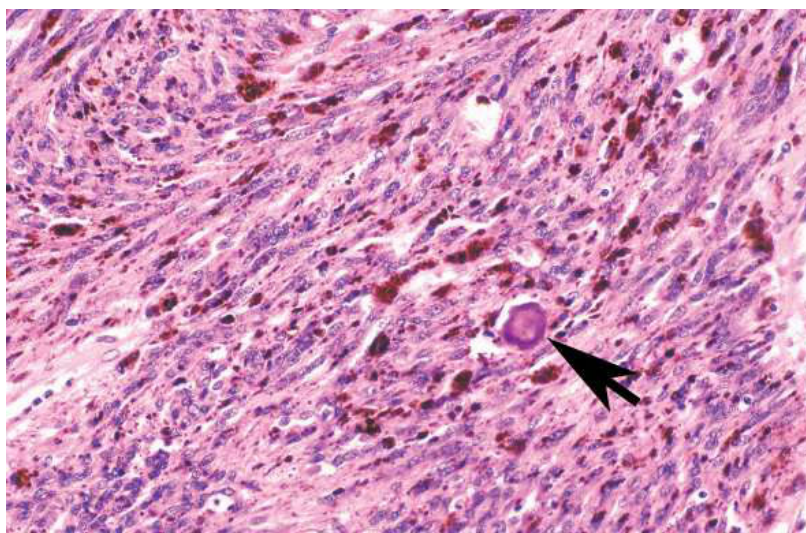


Figure 42 : Coupe histologique d'un schwannome mélanotique chez un patient atteint d'un complexe de Carney
On observe une prolifération fusocellulaire variablement pigmentée avec présence d'un psammome au centre (flèche) (Weiss *et al.*, 2014).

Le schwannome mélanotique ne doit pas être confondu avec les tumeurs mélanocytaires vraies, et en particulier le mélanome. L'historique, l'aspect syncytial et la présence de psammomes sont des éléments importants du diagnostic différentiel (Weiss *et al.*, 2014). De plus, on n'observe pas dans les schwannomes mélanotiques de mutations du gène *GNAQ*, ce qui permet de les distinguer des naevi bleus et des mélanomes leptoméningés (Küsters-Vandeveldel *et al.*, 2010; Van Raamsdonk *et al.*, 2009).

Le comportement des schwannomes mélanotiques est difficilement prédictible et des métastases ont été rapportées en l'absence de signes histologiques de malignité. Par ailleurs ni la taille de la lésion, ni sa ploïdie n'ont de valeur pronostique. On estime qu'environ 13 à 26% des schwannomes mélanotiques donnent lieu à des métastases (Carney, 1990; Vallat-Decouvelaere *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 2014).

Dans les familles atteintes par le complexe de Carney, les schwannomes mélanotiques se développent en moyenne 10 ans plus tôt que dans les cas sporadiques. Les études de liaisons ont permis d'identifier des mutations perte-de-fonction dans le gène *PRKAR1A* qui code une sous-unité régulatrice de la protéine kinase A (PKA) (Kirschner *et al.*, 2000). La PKA se compose de deux unités régulatrices et de deux unités catalytiques, les premières limitant l'activité des secondes jusqu'à ce que l'AMPc soit présent (Kim *et al.*, 2007). On ne sait pas encore par quels mécanismes les mutations de *PRKAR1A* promeuvent la transformation tumorale (Wilkes *et al.*, 2005). L'hypothèse d'un « second coup » comme dans les rétinoblastomes est avancée mais un tel événement n'est pas retrouvé dans toutes les tumeurs (Bossis *et al.*, 2004; Casey *et al.*, 2000; Kirschner *et al.*, 2000). La pigmentation des schwannomes mélanotiques pourrait en revanche s'expliquer par une expression aberrante de *MITF* via une activation de la voie PKA/CREB dans un contexte d'hyperactivité de la PKA (Roh *et al.*, 2013).

Des modèles de souris transgéniques ont été développées pour tenter de reproduire le syndrome de Carney, et ce à partir d'une délétion de l'exon 2 ou des exons 3 à 5 du gène *Prkar1a*. Si l'haploinsuffisance est bien associée au développement de tumeurs (schwannomes, sarcomes myxoïdes, hémangiosarcomes, hépatocarcinomes, tumeurs thyroïdiennes), dans aucun de ces modèles il n'a été observé de schwannomes mélanotiques ou de proliférations mélanocytaires (Figure 43). Les tumeurs observées ne sont par ailleurs pas les mêmes selon les modèles, probablement en raison d'une différence de fonds génétique (Almeida *et al.*, 2010; Kirschner, 2009; Kirschner *et al.*, 2005; Veugelers *et al.*, 2004).

De façon anecdotique, des schwannomes mélanotiques, spontanés ou chimio-induits, ont également été décrits respectivement chez le chien et le hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*) (Ernst *et al.*, 1987; Patnaik *et al.*, 1984).

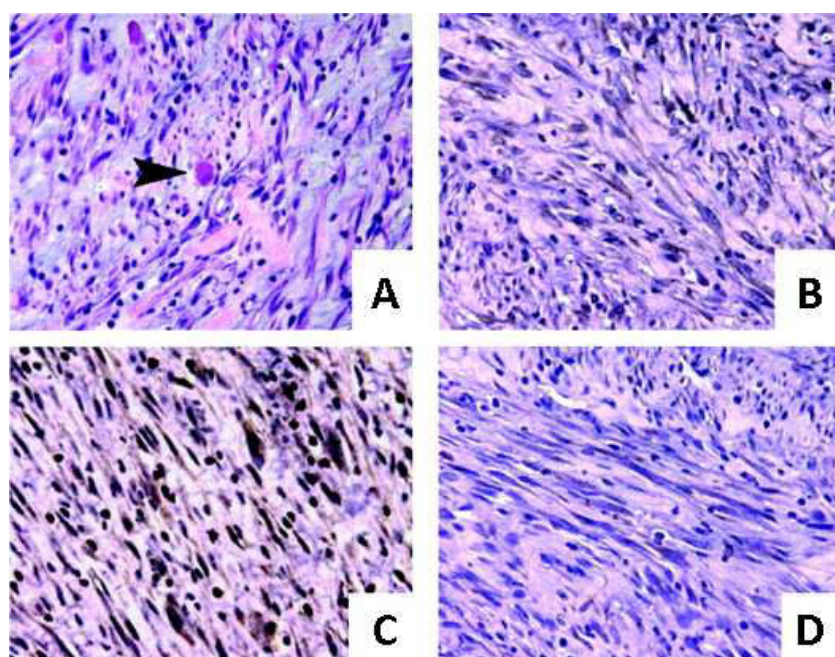


Figure 43 : Schwannome non mélanotique chez une souris *Prkar1a*^{Δ2/+}

A : Prolifération fusocellulaire avec stroma fibromyxoïde. Présence de quelques cellules granuleuses acidophiles (tête de flèche) (coloration HE) ; **B :** Discret marquage anti-NSE ; **C :** Fort marquage cytoplasmique anti-protéine S100 ; **D :** Discret marquage anti-GFAP (Kirschner *et al.*, 2000).

B - La neurofibromatose de type 1

Les neurofibromatoses sont des maladies humaines rares caractérisées par le développement de tumeurs nerveuses multiples. Elles appartiennent à la famille des phacomatoses qui regroupe des maladies génétiques à mode de transmission autosomique dominant caractérisées par des anomalies de développement du tissu ectodermique et se manifestant par des lésions nerveuses, oculaires et cutanées de nature souvent tumorale. Les malades sont porteurs de mutations à l'état hétérozygote dans des gènes suppresseurs de tumeurs et chaque tumeur est la conséquence d'une nouvelle mutation dans l'allèle sauvage (perte d'hétérozygotie ou « second coup »). Les maladies ont

généralement une pénétrance élevée mais une expressivité très variable. Outre les neurofibromatoses, cette famille comprend également la sclérose tubéreuse de Bourneville, la maladie de Von Hippel-Lindau ou l'ataxie-télangiectasie (Korf, 2005).

Il existe deux types de neurofibromatose : la neurofibromatose de type 1 (ou maladie de Von Recklinghausen) et la neurofibromatose de type 2. Seule la neurofibromatose de type 1 (NF1) associe lésions nerveuses et lésions mélanocytaires (Boyd *et al.*, 2009; Korf, 2005).

La NF1 a été décrite pour la première fois par Friedrich Daniel von Recklinghausen en 1881. Il s'agit d'une des maladies génétiques à transmission autosomique dominante les plus fréquentes de l'homme (1 cas pour 3500) (Boyd *et al.*, 2009). Elle résulte d'une mutation dans le gène *NF1* codant la neurofibromine et dont le taux de mutation est le plus haut de toutes les maladies monogéniques connues (Fountain *et al.*, 1989; Theos *et al.*, 2006; Wallace *et al.*, 1990). La grande majorité des malades présentent ainsi des mutations *de novo* et n'ont pas de parents atteints. Les mutations observées sont variées (substitutions, délétions, insertions etc.) et ont été rapportées sur la presque totalité des 60 exons du gène (Messiaen *et al.*, 2000; Theos *et al.*, 2006). La NF1 se caractérise par une pénétrance proche de 100% passé 20 ans mais une expressivité variable, y compris au sein d'une même famille (Boyd *et al.*, 2009; Riccardi et Lewis, 1988).

La neurofibromine est un inhibiteur de RAS dans la voie des MAP kinases. *NF1* est exprimé par les CCN avant leur délamination et continue d'être exprimé par les cellules de Schwann et les mélanocytes au cours de leur développement (Daston et Ratner, 1992; De Schepper *et al.*, 2008; Maertens *et al.*, 2006).

La NF1 est associée à un grand éventail de lésions, cutanées et extra-cutanées (nerveuses, osseuses, oculaires), dont beaucoup concernent le lignage mélanocytaire ou les cellules de Schwann. Certaines de ces lésions sont indispensables au diagnostic clinique de la NF1, lequel repose sur la présence d'au moins deux des critères suivants (« Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference », 1988) :

- Au moins six **taches café-au-lait** (TCAL) de plus de 5 mm (avant la puberté) ou de 15 mm (après la puberté) ;
- Des **lentigines de la région axillaire ou inguinale** ;
- Au moins deux **neurofibromes** ou un neurofibrome plexiforme ;
- Au moins deux **nodules de Lisch** ;
- Un gliome optique ;
- Une lésion osseuse dysplasique caractéristique (pseudarthrose, dysplasie du sphénoïde, amincissement du cortex des os longs) ;
- Un parent de premier degré atteint de NF1.

Il est à noter que ces lésions n'apparaissent pas au même âge et ne co-existent donc pas nécessairement en même temps. Seules les lésions dérivant des mélanocytes et des cellules de Schwann seront ici développées.

1) Taches café-au-lait

Les TCAL correspondent à des plages d'hyperpigmentation cutanées et sont le premier signe de la maladie, présentes dans 99% des cas avant l'âge d'un an (Figure 44). Elles se développent pendant l'enfance mais ont tendance à s'estomper avec l'âge. Bien que ces taches se retrouvent aussi chez les individus sains, avec une incidence comprise entre 3% et 36%, elles ne sont multiples que dans moins de 1% des cas (Boyd *et al.*, 2009).

Histologiquement, elles correspondent à une augmentation de la concentration en mélanine et en mélanosomes géants (macromélanosomes ou macroglobules de mélanine) (Ortonne *et al.*, 1980). Pour certains auteurs, il existerait également une augmentation significative du nombre de mélanocytes mais ce fait est discuté (Close *et al.*, 1997; De Schepper *et al.*, 2006). Les mélanocytes des TCAL sont par ailleurs caractérisés par une mutation « second coup » dans *NF1* qui n'est pas retrouvée dans les mélanocytes de la peau non porteuse de TCAL, ni dans les kératinocytes et fibroblastes des TCAL (De Schepper *et al.*, 2008).

2) Lentigines de la région axillaire ou inguinale

Ce sont les « *skin-fold freckling* » des anglo-saxons. Ces plages d'hyperpigmentation, sortes de « taches de rousseur » de 1 à 3 mm de diamètre, localisées aux plis cutanés (aine et région inguinale) sont presque pathognomoniques de la NF1 et constituent le plus spécifique des signes cardinaux de la NF1 (Boyd *et al.*, 2009) (Figure 44).

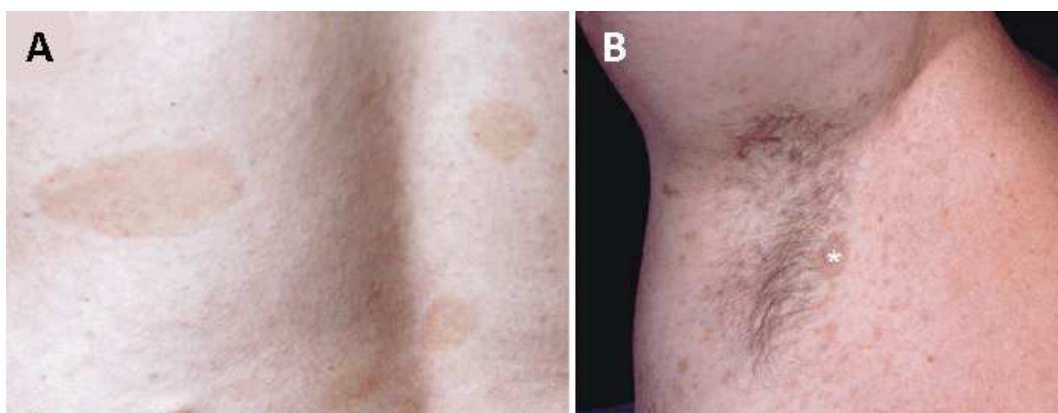


Figure 44 : Taches café-au-lait et lentigines de la région axillaires dans la neurofibromatose de type 1
A : Multiples taches café-au-lait sur le dos d'un patient. B : Lentigines de la région axillaire associées à une tache café-au-lait (astérisque) (De Schepper *et al.*, 2005)

Elles sont en effet retrouvées chez 90% des malades adultes (Huson *et al.*, 1988). Elles se développent plus tardivement que les TCAL, généralement entre l'âge de 3 et 5 ans (Gutmann *et al.*, 1997; Obringer *et al.*, 1989). Bien que ressemblant aux lentigines solaires (« taches de soleil »), elles s'en distinguent par leur distribution aux zones peu ou non exposées au soleil. Leur développement préférentiel aux régions axillaires et inguinales serait la conséquence de phénomènes de friction ou serait lié à la température et/ou à l'humidité plus élevées qui caractérisent ces parties du corps (De Schepper *et al.*, 2005).

3) Neurofibromes

Les neurofibromes sont des tumeurs bénignes des nerfs pouvant survenir sporadiquement (neurofibrome solitaire) ou dans le cadre d'une NF1. On décrit classiquement trois types histologiques de neurofibromes : localisé, diffus et plexiforme. Ces tumeurs sont constituées d'un mélange de cellules de Schwann, de fibroblastes, de mastocytes et de cellules périneurales mêlés à des fibres de collagène. Malgré cette composition hétérogène, seules les cellules de Schwann sont actuellement considérées comme transformées (Boyd *et al.*, 2009). Dans la NF1, il a été montré que, comme les mélanocytes de TCAL, les cellules de Schwann dérivées des neurofibromes arborent une mutation germinale et une mutation « second coup » dans le gène *NF1*, cette dernière étant différente pour chaque tumeur d'un même patient (Maertens *et al.*, 2006).

Sur le plan anatomo-clinique, on distingue les **neurofibromes cutanés** (au sens large) et les **neurofibromes plexiformes** (Boyd *et al.*, 2009; Van Raamsdonk et Deo, 2013) (Figure 45). Les neurofibromes cutanés peuvent se développer dans n'importe quelle région du corps et montrent une grande variété de formes et de tailles. Ils sont présents chez 95% des patients atteints de NF1 (McClatchey, 2007). Les neurofibromes dits cutanés (au sens strict), ou dermiques, forment des dômes mous, charnus et recouverts par une peau de couleur normale ou légèrement hyperpigmentée alors que les neurofibromes dits sous-cutanés sont fermes et nodulaires. Les neurofibromes cutanés ne se développent généralement qu'à la puberté et continuent de croître et d'augmenter en nombre pendant la vie (Boyd *et al.*, 2009). Du point de vue histologique, les neurofibromes cutanés observés dans la NF1 sont similaires aux neurofibromes sporadiques (Weiss *et al.*, 2014). Rarement, ils peuvent subir une transformation maligne.

Contrairement aux neurofibromes cutanés, les neurofibromes plexiformes sont pathognomoniques de la NF1 pour peu qu'on leur applique une définition stricte. Ils s'en distinguent également par leur nature habituellement congénitale, par leur localisation ubiquitaire et par leurs caractéristiques morphologiques. La prolifération cellulaire se produit ici à l'intérieur des filets nerveux et s'étend diffusément, produisant un aspect en « sac de vers ». Les neurofibromes plexiformes cutanés superficiels sont souvent recouverts d'une peau présentant une hyperpigmentation et/ou une hypertrichose, ce qui peut prêter à confusion avec un névus mélanocytaire géant congénital (De

Schepper *et al.*, 2005). Les neurofibromes plexiformes sont plus susceptibles de subir une transformation maligne que les neurofibromes cutanés. On estime qu'environ 10% des patients atteints de NF1 développeront une tumeur maligne de la gaine des nerfs périphériques, et ce généralement à partir d'un neurofibrome plexiforme pré-existant (Boyd *et al.*, 2009).

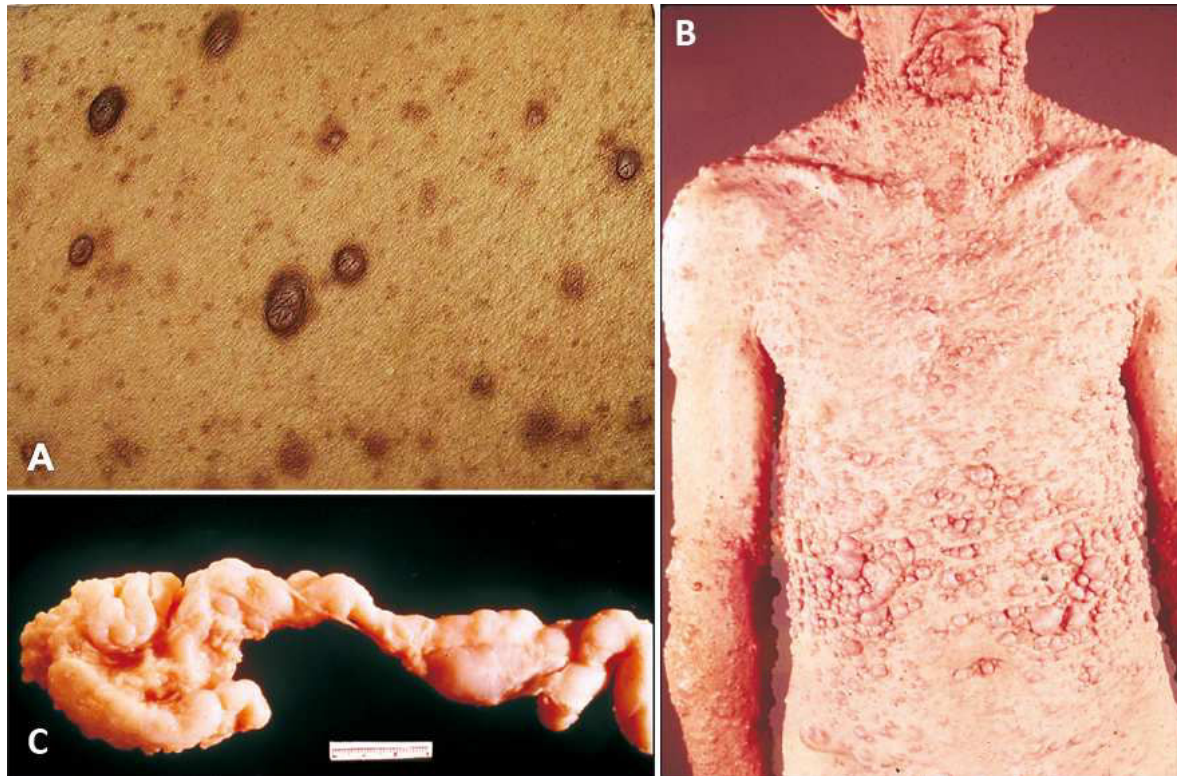


Figure 45 : Neurofibromes dans la neurofibromatose de type 1

A : Multiples neurofibromes cutanés recouverts d'une peau hyperpigmentée (Boyd *et al.*, 2009) ; **B :** Patient atteint d'une neurofibromatose de type 1 d'évolution longue avec présence de très nombreux neurofibromes cutanés (Weiss *et al.*, 2014) ; **C :** Neurofibrome plexiforme isolé. Noter l'aspect « en sac de vers » (Weiss *et al.*, 2014).

Un variant rare de neurofibrome (moins de 1% des cas), appelé neurofibrome pigmenté, a également été décrit (Bird et Willis, 1969; Weiss *et al.*, 2014). Il survient chez des patients atteints de NF1 avec une forme diffuse. Cette tumeur est bénigne et, bien que pouvant récidiver après exérèse, aucune métastase n'a été rapportée à ce jour. La pigmentation, généralement invisible à l'examen clinique, s'observe à l'examen histologique dans des cellules de formes dendritiques à épithélioïdes. Ces cellules, disséminées au sein de la tumeur, ont une tendance à former des paquets et à se répartir dans les parties superficielles. Elles expriment à la fois la protéine S100 et des marqueurs de mélanocytes (tyrosinase, positivité au marquage par le HMB-45) contrairement aux cellules non-pigmentées environnantes qui n'expriment que la protéine S100 (Bird et Willis, 1969; Fetsch *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2014). A l'heure actuelle, il n'a pas été déterminé si ces cellules sont des mélanocytes ou des cellules de Schwann pigmentées. Le derme humain ne contenant pas à l'état normal de mélanocyte, cette pigmentation apparaît de toute évidence ectopique (Van Raamsdonk et Deo, 2013).

4) Nodules de Lisch

Les nodules de Lisch (NL) sont de petites macules en dôme hyperpigmentées de l'iris qui ne perturbent pas la vision (Figure 46). A l'âge de 6 ans, 15-20% des enfants atteints de NF1 en présentent et leur prévalence atteint 95% chez les adultes. Leur observation nécessite un examen oculaire à l'aide d'une lampe à fente par un praticien expérimenté (Boyd *et al.*, 2009). Ces lésions sont constituées de mélanocytes, de cellules ressemblant à des fibroblastes et de mastocytes. Bien qu'elles soient depuis longtemps considérées comme des hamartomes, certains auteurs y voient un variant irien de neurofibrome (Richetta *et al.*, 2004).

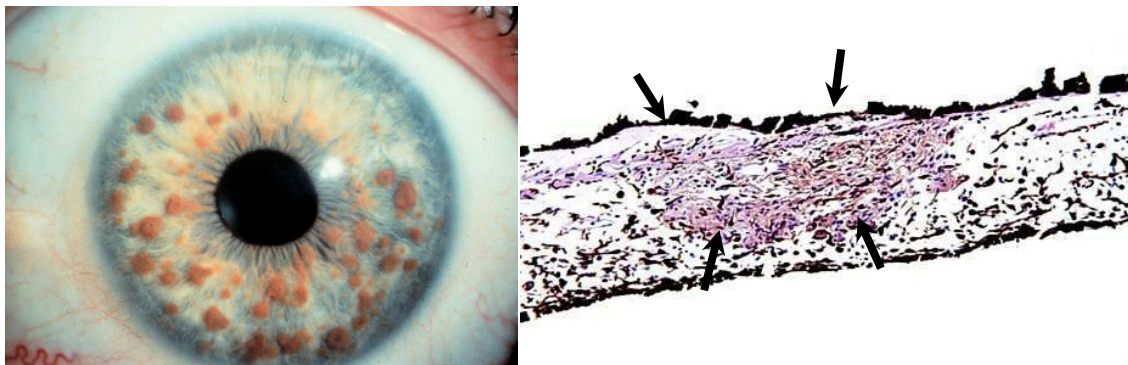


Figure 46 : Nodules de Lisch dans la neurofibromatose de type 1

Œil d'un patient atteint de NF1. A gauche : Multiples nodules de Lisch, principalement en partie inférieure de l'iris. Il s'agit de petites macules hyperpigmentées. A droite : Coupe histologique d'un iris présentant un nodule de Lisch (flèche). La lésion est constituée de mélanocytes pigmentés mêlés à des cellules ressemblant à des fibroblastes (coloration HE, objectif 100) (Dahl, 2013).

5) NF1 et mélanome

Les patients atteints de NF1 ont un risque quatre fois plus grand de développer un cancer que la population générale (Zöller *et al.*, 1997). Le développement d'un mélanome dans le cadre d'une NF1 a été décrit pour la première fois en 1934 (Bjorneboe, 1934) et de nombreux cas ont depuis été rapportés. Un lien de causalité n'est cependant pas clairement démontré à l'heure actuelle. Les mélanomes décrits dans la NF1 sont de sièges variés et peuvent être oculaires, leptoméningés, muqueux ou cutanés. Ces derniers sont rapportés dans un 0,1 à 5,4% des patients atteints de NF1.

L'augmentation du nombre de mélanocytes cutanés lors de NF1, particulièrement au niveau des TCAL, est en faveur d'une prolifération mélanocytaire anormale. Dans ce contexte, on peut supposer que le développement de mélanome chez des patients atteints de NF1, plus qu'une simple coïncidence, puisse être la conséquence d'une prédisposition particulière des mélanocytes à la transformation maligne, en lien avec des mutations du gène *NF1*. Cette hypothèse semble d'autant plus plausible que des mutations de *NF1* ont été retrouvées dans d'autres tumeurs dérivant de CCN (tumeurs malignes de la gaine des nerfs périphériques, phéochromocytomes, naevi mélanocytaires congénitaux géants etc.).

Les principales différences constatées entre les mélanomes conventionnels et les mélanomes dans un contexte de NF1 sont une prédominance de patients féminins, un âge plus jeune au moment du diagnostic et un indice de Breslow plus élevé. Cette dernière observation pourrait être expliquée par un retard au diagnostic résultant de la difficulté d'identifier un mélanome parmi la constellation de lésions cutanées et pigmentées présentes sur la peau des patients atteints de NF1 (Guillot *et al.*, 2004).

6) Modèles murins de NF1

Plusieurs modèles de NF1, selon différentes stratégies, ont été développés à partir de souris transgéniques (Gutmann et Giovannini, 2002). Les premiers modèles ont utilisé l'invalidation génique de *Nf1* pour reproduire la maladie. Si les individus *Nf1*^{-/-} meurent au cours du développement embryonnaire, les individus *Nf1*^{+/-}, eux, sont en revanche viables et fertiles. Ils meurent cependant prématurément vers 15-18 mois suite au développement de leucémies ou de phéochromocytomes. Contrairement aux patients atteints de NF1, ils ne développent pas spontanément de neurofibromes et aucune anomalie de la pigmentation n'a été rapportée (Jacks *et al.*, 1994). Le développement de tumeurs nerveuses nécessite d'autres stratégies comme l'utilisation d'individus chimères possédant des cellules *Nf1*^{+/-} et *Nf1*^{-/-} et produisant des tumeurs ressemblant aux neurofibromes plexiformes, ou l'invalidation concomitante de p53 (*p53*^{+/-}) chez des souris *Nf1*^{+/-}, conduisant au développement de tumeurs malignes de la gaine des nerfs périphériques (Cichowski *et al.*, 1999; Vogel *et al.*, 1999). D'autres modèles parviennent à reproduire des neurofibromes grâce à une inactivation conditionnelle de l'allèle floxé *Nf1*^{flox} via une recombinaise cre exprimée sous contrôle du promoteur d'un gène spécifique des cellules de Schwann comme *Dhh* (Desert hedgehog), *Krox-20* ou *Plp* (Mayes *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2002). Chez les souris *Plp1-creER* ; *Nf1*^{flox/flox}, la construction entraîne l'inactivation des deux allèles de *Nf1* dans les cellules de Schwann après traitement au tamoxifène (Mayes *et al.*, 2011). Il en résulte la formation de nombreux et volumineux neurofibromes (Figure 47).

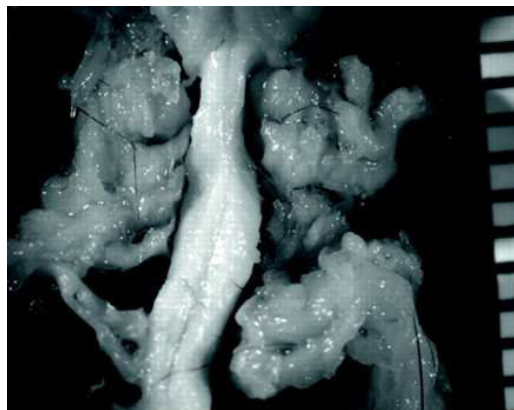


Figure 47 : Neurofibromes plexiformes chez les souris *Plp1-creER Nf1*^{flox/flox}

Volumineux neurofibromes plexiformes se développant sur la racine des nerfs, de part et d'autre de la moelle épinière (Mayes *et al.*, 2011).

L'inactivation biallélique de *Nf1* dans les cellules de Schwann immatures chez les souris *Dhh-cre* ; *Nf1^{flox/flox}* aboutit également à la formation de neurofibromes (Wu *et al.*, 2008). Fait notable ici, des neurofibromes pigmentés et/ou une pigmentation des méninges recouvrant la moelle épinière étaient observés chez 39% des souris mutantes alors que *Dhh-cre* ne semble pas induire de recombinaison dans les mélanocytes (Hari *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008). Cette observation suggère que les cellules de Schwann *Nf1^{-/-}* puissent exprimer des caractéristiques de mélanocytes ou recruter des mélanocytes à des sites ectopiques.

Si la plupart des modèles de NF1 s'attachent à reproduire le phénotype tumoral de la maladie, peu parviennent (ou cherchent) à reproduire les lésions mélanocytaires caractéristiques de la maladie. Récemment, il a cependant été décrit chez les souris *Dark Skin 9 (Dsk9)*, une souche C3HeB/FeJ porteuse d'une mutation faux-sens chimio-induite de *Nf1*, une légère hyperpigmentation épidermique et dermique (Figure 48). Une hyperpigmentation, plus prononcée, est également retrouvée chez les souris pour lesquelles les deux copies du gène *Nf1* ont été spécifiquement invalidées dans les mélanocytes, reproduisant ainsi la pathogénie des TCAL. Les auteurs ne rapportent pas de développement de tumeurs, et en particulier de neurofibromes, chez ces animaux (Deo *et al.*, 2013).



Figure 48 : Hyperpigmentation épidermique chez les souris *Dsk9*

Comparaison entre les pavillons auriculaires (A), les queues (B) et la face palmaire des membres antérieurs (C) entre souris sauvages (à gauche) et souris *Nf1*^{+/-} (à droite)(Deo *et al.*, 2013).

C - Le mélanome desmoplastique

Chez l'homme, le mélanome desmoplastique est un variant rare de mélanome à cellules fusiformes caractérisé par un envahissement dermique plutôt qu'épidermique. Il concerne principalement les individus âgés et siège au niveau des régions exposées au soleil, particulièrement la tête et le cou. Le diagnostic est difficile car il peut être confondu avec un neurofibrome, un dermatofibrome ou même une cicatrice. Les cellules tumorales, souvent non pigmentées, ont en effet la particularité de former des faisceaux rappelant les cellules de Schwann et leur gaine de myéline. Le qualificatif « desmoplastique » fait par ailleurs référence à l'abondant stroma collagène qui entoure les cellules tumorales (Figure 49) (Chen *et al.*, 2013; Huttenbach *et al.*, 2002; Mooi et Krausz, 2007). L'origine mélanocytaire de cette tumeur est étayée par plusieurs observations, notamment la présence dans 83% des cas d'une composante épidermique associée (type mélanome lentigineux ou mélanome superficiel extensif) ainsi que d'éléments caractéristiques de mélanome à l'examen dermoscopique

(vaisseaux atypiques, « grains de poivre », voile blanc-bleu, globules etc.) (Chen *et al.*, 2013; Jaimes *et al.*, 2013).

Malgré cela, les cellules de mélanome desmoplastique ne possèdent pas de mélanosomes, ni même de pré-mélanosomes, et sont négatives pour le HMB-45 (Orchard, 2000). Elles expriment en revanche des marqueurs précoces de CCN (p75^{NGFR}, N-CAM, périphérine), montrent parfois une expression focale de la tyrosinase et de MITF mais n'expriment pas de marqueurs spécifiques des cellules de Schwann (myéline par exemple) (Penneys *et al.*, 1984). Elles expriment habituellement les protéines S100 et SOX10, deux marqueurs communs aux mélanocytes et aux cellules de Schwann (Mohamed *et al.*, 2013; Palla *et al.*, 2013).

Aucune mutation caractéristique n'a été décrite dans les mélanomes desmoplastiques (Chen *et al.*, 2013). La ressemblance avec les tumeurs des gaines nerveuses a néanmoins conduit à rechercher des mutations dans *NF1*. Il apparaît que 67% des mélanomes desmoplastiques arborent une perte d'hétérozygotie dans *NF1* alors que celle-ci n'est retrouvée que dans 5% des mélanomes conventionnels. Néanmoins, une mutation dans le second allèle n'a pour l'instant pas été démontrée et les mélanomes desmoplastiques ne sont pas plus fréquents chez les patients atteints de NF1 (Gutzmer *et al.*, 2000).

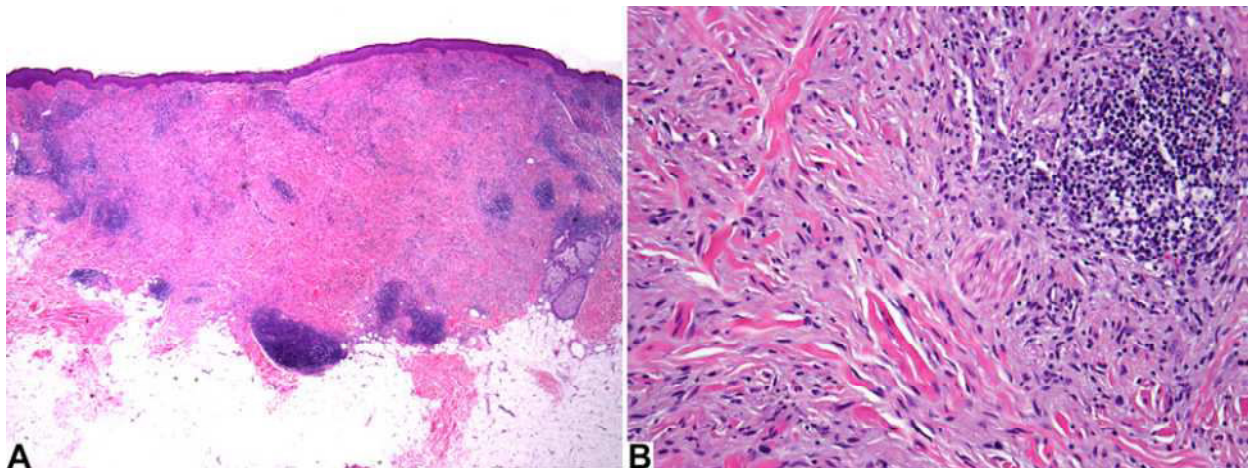


Figure 49 : Caractéristiques histopathologiques du mélanome desmoplastique

Le mélanome desmoplastique prend la forme d'une prolifération mal délimitée dans le derme (A) et composée de cellules fusiformes non pigmentées, séparées par un abondant stroma collagène (B). Coloration hématoxyline-éosine (d'après Chen *et al.*, 2013).

RESULTATS

I - DEVELOPPEMENT D'UN OUTIL DE VISUALISATION DU LIGNAGE MELANOCYTAIRE DANS LA PEAU

Nous avons vu précédemment que *Pax3* est exprimé dans les précurseurs de mélanoblastes, les mélanoblastes, les mélanocytes et les CSM du follicule pileux. *Pax3* est également exprimé dans le lignage glial par les PCS, les cellules de Schwann immatures et les cellules de Schwann non myélinisantes.

Dans la lignée de souris transgénique *Pax3^{GFP/+}*, la séquence de l'eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) a été insérée au locus *Pax3*. L'allèle *Pax3^{GFP}* est par ailleurs un allèle nul. Compte-tenu de patron d'expression de *Pax3* dans la peau, nous avons voulu évaluer l'allèle *Pax3^{GFP}* en tant que rapporteur du lignage mélanocytaire tout au long du développement mais également chez l'adulte. Nous avons montré que l'eGFP était bien visible dans les mélanoblastes et les mélanocytes de l'épiderme et des follicules pileux chez les souris *Pax3^{GFP/+}*, et ce à tous les stades de différenciation. Nous avons pour cela produit des doubles mutants *Pax3^{GFP/+} ; Tg(Dct::lacZ)* qui expriment également le gène rapporteur *LacZ* sous contrôle du promoteur de *Dct*. Chez ces animaux, toutes les cellules β gal-positives exprimaient également eGFP. Dans le derme, certaines cellules exprimaient eGFP mais étaient pas β gal-négatives : il ne s'agissait donc pas de cellules du lignage mélanocytaire.

L'expression de l'eGFP nous a permis de trier au cytomètre en flux les cellules de la peau des souris *Pax3^{GFP/+}*. Nous avons isolé une population de cellules GFP^{high} et une autre GFP^{low}. Les cellules GFP^{high} mises en culture sans cellules nourricières donnent rapidement des cultures pures de mélanocytes. Les cellules GFP^{low} en revanche ne se sont pas différenciées en mélanocytes. Nous avons montré que ces cellules GFP^{low} correspondaient aux cellules eGFP-positives β gal-négatives du derme et qu'il s'agissait de cellules de Schwann et des cellules Nestin positives du réseau nerveux interfolliculaire.

Ces travaux nous ont permis de valider l'allèle *Pax3^{GFP}* comme outil de visualisation du lignage mélanocytaire dans la peau. Cet outil permet par ailleurs de trier en cytométrie en flux les cellules du lignage mélanocytaire sur la base d'une forte expression de la GFP.

L'ensemble de ces données sont présentées dans l'article qui suit. Dans ce travail, j'ai participé à la préparation des suspensions des cellules de peau pour le tri en cytométrie en flux et au tri.

ARTICLE 1

***Pax3^{GFP}*, a new reporter for the melanocyte lineage, highlights novel aspects of PAX3 expression in the skin**

(Publié dans Pigment Cell and Melanoma Research)

***Pax3^{GFP}*, a new reporter for the melanocyte lineage, highlights novel aspects of PAX3 expression in the skin**

Johanna Djian-Zaouche^{1,2,3,*}, Cécile Campagne^{1,2}, Edouard Reyes-Gomez^{1,2,4},
Stéphanie Gadin-Czerw^{1,2}, Florence Bernex^{1,2,4,†}, Anne Louise⁵, Frédéric Relaix^{6,‡},
Margaret Buckingham⁶, Jean-Jacques Panthier^{1,2,3} and Geneviève Aubin-Houzelstein^{1,2,3}

1 INRA, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France **2** Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale, Maisons-Alfort, France **3** CNRS URA 2578, Département de Biologie du Développement; USC INRA 2026, Institut Pasteur, Unité de Génétique Fonctionnelle de la Souris, Paris, France **4** Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité d'Embryologie, d'Histologie et d'Anatomie Pathologique, Maisons-Alfort, France **5** Plate-forme de Cytométrie, Département d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, France **6** CNRS URA 2578, Département de Biologie du Développement; Institut Pasteur, Unité de Génétique Moléculaire du Développement, Paris, France

CORRESPONDENCE Geneviève Aubin-Houzelstein, e-mail: ghouselstein@vet-alfort.fr

KEYWORDS mouse/paired-box gene/*Dct::lacZ*/nestin-positive cells/melanoblast/melanocyte stem cell

PUBLICATION DATA Received 30 March 2012, revised and accepted for publication 21 May 2012, published online 23 May 2012

doi: 10.1111/j.1755-148X.2012.01024.x

Summary

The paired box gene 3 (*Pax3*) is expressed during pigment cell development. We tested whether the targeted allele *Pax3^{GFP}* can be used as a reporter gene for pigment cells in the mouse. We found that enhanced green fluorescent protein (GFP) can be seen readily in every melanoblast and melanocyte in the epidermis and hair follicles of *Pax3^{GFP/+}* heterozygotes. The GFP was detected at all differentiation stages, including melanocyte stem cells. In the dermis, Schwann cells and nestin-positive cells of the piloneural collars resembling the nestin-positive hair follicle multipotent stem cells exhibited a weaker GFP signal. Pigment cells could be purified by fluorescent activated cell sorting and grown in vitro without feeder cells, giving pure cultures of melanocytes. The Schwann cells and nestin-positive cells of the piloneural collars were FACS-isolated based on their weak expression of GFP. Thus *Pax3^{GFP}* can discriminate distinct populations of cells in the skin.

Introduction

In the neural crest of the mouse embryo, there are two distinct sources of melanocytes (Sommer, 2011). Melanocytes in the skin can derive from neural crest cells that migrate following a dorso-lateral pathway between the dermomyotome and the epidermis, from embryonic day 8.5 (E8.5) onwards. Alternatively, melanocytes can be generated indirectly from fate-restricted neural crest cells, the Schwann cell precursors, and delaminate from the forming nerves in a ventral pathway, around E11

(Adameyko et al., 2009). Between E12.5 and E14.5, melanoblasts colonize the developing epidermis and proliferate. From E14.5 on, they move into the forming hair follicles (HFs). At birth, most skin melanocytes and their precursors are located within the HFs. The first wave of melanocytes providing hair pigmentation is derived from epidermal melanoblasts that migrate directly to the hair bulb within the outer root sheath (ORS), the most external layer of the HF, at the end of embryogenesis. Melanoblasts reaching the lower permanent portion (LPP) of the HF, within the bulge area, find an environment suit-

Significance

In this report, the *Pax3^{GFP}* allele is validated as a convenient and sensitive reporter for pigment cells in the epidermis and hair follicles. *Pax3^{GFP}* provides a FACS usable marker for melanoblasts and melanocytes from embryonic and neonatal skin and can be used to obtain pure cultures of melanocytes.

able for their quiescence and become melanocyte stem cells (MSCs) (Nishikawa and Osawa, 2007). At the beginning of each hair cycle, MSCs self-renew and give rise to a progenitor population, the transit amplifying (TA) cells of the melanocyte lineage. TA cells proliferate and migrate within the ORS to reach the matrix of the hair bulb where they complete their differentiation into mature, pigmented melanocytes.

Key transcription factors for melanocyte development are the SRY-box factor 10 (SOX10), the basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factor MITF, and the paired box transcription factor PAX3 (Hornyak, 2006). The PAX3 transcription factor activates a variety of developmental genes during myogenesis, neurogenesis and melanogenesis (Kubic et al., 2008). In the mouse embryo, high levels of *Pax3* expression are first detected at E8.5 throughout the dorsal part of the neural tube, particularly in the regions from which neural crest cells migrate (Goulding et al., 1991). At later stages, *Pax3* transcripts are found in neural crest cells and in melanoblasts during their migration through the mesenchyme, between the dermomyotome and the epidermis. PAX3 is not required for specification of melanoblasts from neural crest cells but it is required to expand a pool of committed melanoblasts early in development (Hornyak et al., 2001). Indeed, PAX3 and SOX10 operate synergistically to activate MITF expression, the activity of which is required for the initial survival of melanoblasts during development (Bondurand et al., 2000; Potterf et al., 2000). Postnatally, *Pax3* is expressed in pigment cells within the HF (Osawa et al., 2005). PAX3 is believed to play a key role in the differentiation of MSCs. Indeed, PAX3 is able to promote MSC differentiation by directly activating the transcription of the *Mitf* gene and of the *Tyrosinase related protein-1* (*Tyrp1*) gene, encoding a pro-

tein involved in melanin synthesis (Galibert et al., 1999; Lang et al., 2005; Watanabe et al., 1998). However, PAX3 may simultaneously maintain MSCs in an undifferentiated state by acting as a competitive inhibitor of MITF in its activation of the *Dopachrome tautomerase* (*Dct*) gene, encoding another member of the tyrosinase gene family (Lang et al., 2005).

The *Pax3^{GFP/+}* mouse line carries a DNA sequence encoding enhanced green fluorescent protein (GFP) inserted into exon 1 of *Pax3* (Relaix et al., 2005). Because *Pax3* is transcribed by melanoblasts as soon as they emigrate from the neural crest (Hornyak, 2006), the *Pax3^{GFP}* allele may prove to be a valuable reporter for the melanocyte lineage during embryogenesis. Furthermore, as PAX3 is expressed in MSCs, in TA cells and in melanocytes, the *Pax3^{GFP}* allele may also be a convenient marker to identify pigment cells within the HF during postnatal life. The present study assesses *Pax3^{GFP}* as a reporter for pigment cells.

Results and Discussion

Distribution pattern of green fluorescent cells in the skin of *Pax3^{GFP/+}* embryos and mice

The *Pax3^{GFP}* allele was obtained by introducing a DNA sequence encoding GFP into exon 1 of the *Pax3* gene (Relaix et al., 2005). *Pax3^{GFP/GFP}* embryos die in utero at about E14, like *Pax3^{Sp/Sp}* embryos (Epstein et al., 1993; Relaix et al., 2005). C57BL/6J-*Pax3^{GFP/+}* congenic mice (referred to as *Pax3^{GFP/+}* mice) are black with a white belly spot, feet and tail tip (Supporting Information Figure S1A). In *Pax3^{GFP/+}* embryos, the pattern of expression for GFP corresponds to what is known for *Pax3* (Figure S1B) (Relaix et al., 2003). To test *Pax3^{GFP}* as a reporter gene for pigment cells, we examined the distribution of green

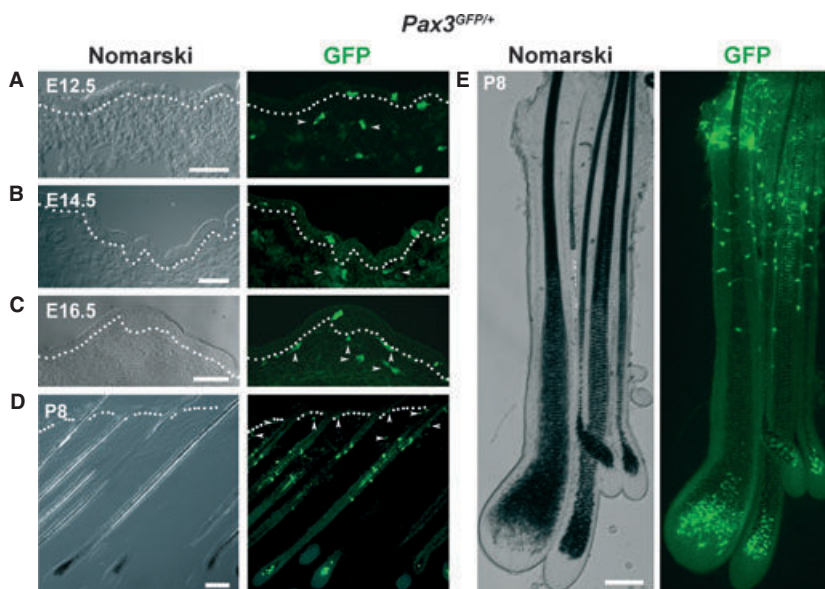


Figure 1. Distribution of GFP-positive cells in the skin of *Pax3^{GFP/+}* mice. GFP⁺ cells were visualized directly under a fluorescence microscope. (A–C): Transverse sections of the truncal back skin from *Pax3^{GFP/+}* embryos at E12.5 (A), E14.5 (B) and E16.5 (C). All optic sections were taken at the level of the forelimb. (D) Transverse section of the back skin of a *Pax3^{GFP/+}* mouse at P8. (E) Anagen VI hair follicles isolated from the back skin of a *Pax3^{GFP/+}* mouse at P8. The epidermis shows background signal due to autofluorescence in keratinocytes. Dotted lines indicate the position of the epidermis basement membrane. Arrowheads point to GFP⁺ cells located in the dermis. Section thickness: 1 μ m (A–C), 10 μ m (D). Bars: 50 μ m (A–C), 150 μ m (D), 200 μ m (E).

fluorescence elicited by direct illumination with blue light on histological sections of skin from *Pax3^{GFP/+}* embryos at E12.5, E14.5 and E16.5 and from mice at postnatal days (P) 8 and 28, corresponding to anagen VI of the two first hair cycles (Muller-Rover et al., 2001). At every stage, the GFP signal conferred by *Pax3^{GFP}* was strong in the nucleus and weaker in the cytoplasm.

At E12.5, fluorescent GFP-positive (GFP⁺) cells were located mostly in the dorsal mesenchyme under the forming epidermis and rarely in the forming epidermis (Figures 1A and 2A). Isolated GFP⁺ cells were seen in the skin all along the anteroposterior axis although most were concentrated at the level of the forelimbs. At E14.5 and E16.5, GFP⁺ cells were located in the dermis, the epidermis and the forming HFs along the anteroposterior axis (Figures 1B–C and 2B–C). Neural crest-derived melanocytes also colonize the vibrissae, the choroid in the eye and the inner ear. We found GFP⁺ cells in these locations at E14.5 and E16.5 (Figure S1C–E). Interestingly, no GFP⁺ cells were found in the pigmentary epithelium of the retina (Figure S1D), which suggests that pigment cells derived from the optic cup do not express *Pax3*.

We studied the distribution of GFP⁺ cells in the dorsal skin of *Pax3^{GFP/+}* mice at P8 and P28. GFP⁺ cells were found in the dermis, the epidermis and the HFs (Figures 1D and S1G). The dermal GFP⁺ cells were especially numerous in the snout, allowing assessment of the genotype at the *Pax3* locus (Figure S1C,F). During postnatal life, most pigment cells are located in the HFs. Thus we focused our study on the GFP⁺ cells within the HFs. Three populations of pigment cells were shown to reside in the HF: MSCs in the bulge area, TA cells in the upper transient part, and melanocytes in the hair matrix (Nishimura et al., 2002). At both P8 and P28, GFP⁺ cells were seen in the HF in all three locations (Figure 1E). In the hair matrix, GFP⁺ cells contained melanin granules, indicating that they were differentiated melanocytes (Figure 1D–E).

To test whether GFP expression reflects PAX3 protein expression, we performed double immunolabellings for PAX3 and GFP on histological sections from *Pax3^{GFP/+}* embryos at E12.5, E14.5 and E16.5 and mice at P8. At E12.5, E14.5 and E16.5, most PAX3-expressing cells were labelled with the GFP antibody but some GFP-expressing cells exhibited no PAX3 labelling (Supporting Information Figure S2A–C arrowheads). This most likely resulted from the stability of the GFP protein compared to PAX3, as previously observed in the skeletal muscle lineage (Relaix et al., 2005). In the skin of *Pax3^{GFP/+}* embryos, every PAX3-expressing cell was GFP positive. At P8, GFP and PAX3 signals were generally colocalized in the same HF cells (Figure S2D–E).

Altogether, the distribution pattern of the GFP⁺ cells in the epidermis and HF of *Pax3^{GFP/+}* embryos and mice mimicked the known distribution pattern of neural crest-derived pigment cells.

***Pax3^{GFP}* labels every cell of the melanocyte lineage**

To determine whether GFP⁺ cells in the skin of *Pax3^{GFP/+}* embryos were pigment cells, we compared *Pax3^{GFP}* with *Tg(Dct::lacZ)*, the reporter gene most commonly used for pigment cells. *Tg(Dct::lacZ)* mice carry a transgene containing a mouse *Dct* promoter fused to the coding sequence of the bacterial *lacZ* gene (Mackenzie et al., 1997). We compared the expression of GFP and β -galactosidase (β gal) by performing immunolabellings for β gal on skin sections from *Pax3^{GFP/+}; Tg(Dct::lacZ)* embryos and mice. At E12.5, E14.5 and E16.5, all β gal-positive (β gal⁺) melanoblasts in the epidermis and forming HFs displayed a strong GFP signal (Figure 2A–C). By contrast, in the dermis at every stage analyzed, some GFP⁺ cells failed to express β gal, indicating that they were not pigment cells (for an example, see Figure 2B, arrowhead). Finally, β gal⁺ melanoblasts in the vibrissae, in the ocular choroid and in the forming inner ear of E14.5 and E16.5 embryos were also GFP⁺ (data not shown).

In the ORS of HFs from *Pax3^{GFP/+}; Tg(Dct::lacZ)* mice at P0, P8 and P28, all β gal⁺ cells were also GFP⁺ (Figure 2D–G), indicating that they were pigment cells. In particular, at the LPP level where several types of stem cells can be found, every GFP⁺ cell was also β gal⁺ even though the intensity of the β gal signal was faint in some of them (Figure 2F,G, number of HFs analyzed: $n = 149$).

We produced embryos and mice carrying *Pax3^{GFP}* and lacking the pigment cells of neural crest origin. To this end, we took advantage of two mutations at the *Kit* locus that encodes KIT, the tyrosine kinase receptor for Stem cell factor. KIT activity is required for survival of melanoblasts from E11.5 onwards (Cable et al., 1995). The *Kit^{W-v}* missense mutation is a hypomorphic allele (Nocka et al., 1990). The *Kit^{W-lacZ}* null mutation was produced by insertion of the *lacZ* gene in place of the first exon in the *Kit* gene (Bernex et al., 1996). In *Kit^{W-v/W-v}*, *Kit^{W-v/W-lacZ}* and *Kit^{W-lacZ/W-lacZ}* embryos, few melanoblasts are determined from the neural crest and their survival is impaired so that no pigment cell is found in the skin by E14.5 (Hou et al., 2000; Mackenzie et al., 1997). Hence, *Kit^{W-v/W-v}* and *Kit^{W-v/W-lacZ}* mutant mice have a white coat due to the absence of skin pigment cells (Supporting Information Figure S3A). We analyzed the pattern of GFP⁺ cells in the skin of *Pax3^{GFP/+}; Kit^{W-v/W-lacZ}* embryos from E12.5 to E16.5 and of *Pax3^{GFP/+}; Kit^{W-v/W-lacZ}* mice at P8. No GFP⁺ cells were seen in the epidermis and in the developing HFs of *Pax3^{GFP/+}; Kit^{W-v/W-lacZ}* embryos (Figure S3B–C). Similarly, no GFP⁺ cells were seen in the ORS and hair matrix of the HFs or in the epidermis of the dorsal trunk of *Pax3^{GFP/+}; Kit^{W-v/W-lacZ}* mice at P8 (Figure S3D). We conclude that the GFP⁺ cells in the epidermis and within the ORS and hair matrix of the HFs of *Pax3^{GFP/+}* embryonic and postnatal skin are pigment cells.

These results show that *Pax3^{GFP}* allows the unambiguous identification of pigment cells in the epidermis and in the HFs of *Pax3^{GFP/+}* mice.

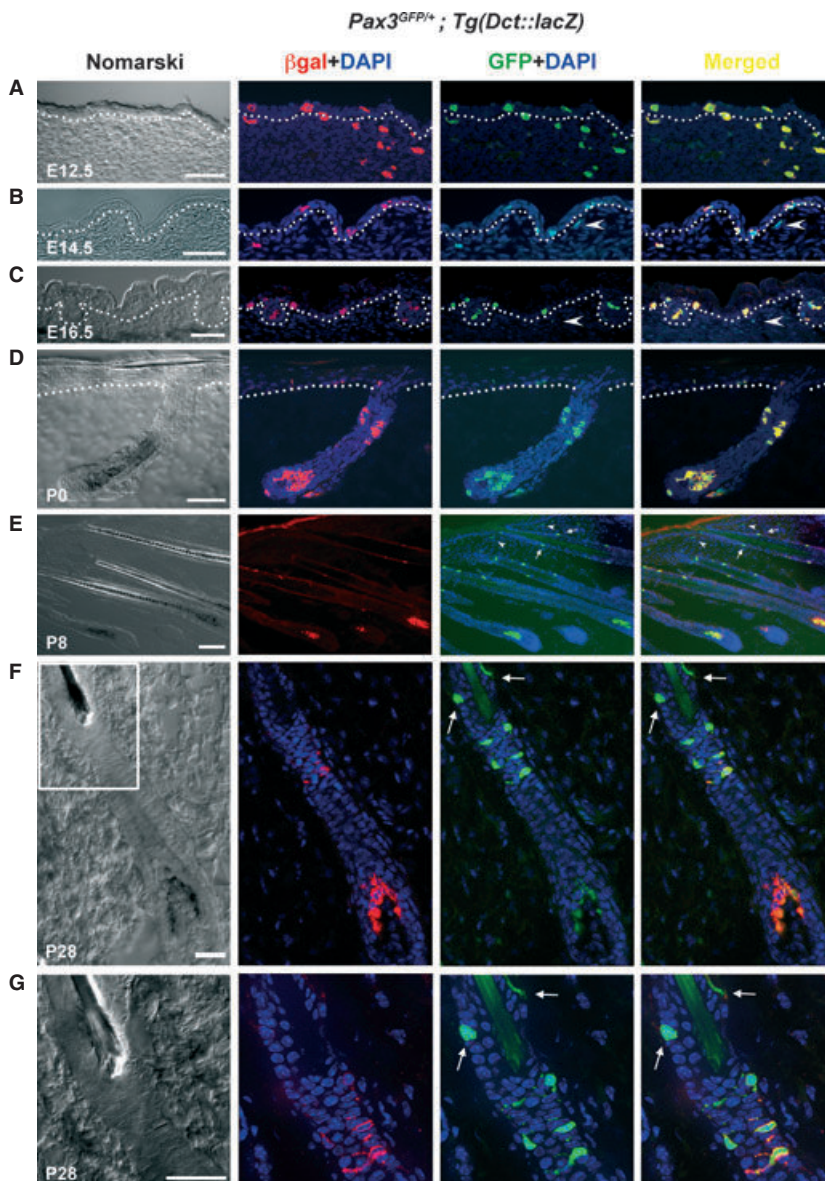


Figure 2. Expression of GFP and β -galactosidase in the skin of $Pax3^{GFP/+}; Tg(Dct::lacZ)$ mice. Transverse sections of the truncal back skin from $Pax3^{GFP/+}; Tg(Dct::lacZ)$ embryos at E12.5 (A), E14.5 (B), and E16.5 (C) and from $Pax3^{GFP/+}; Tg(Dct::lacZ)$ mice at P0 (D), P8 (E) and P28 (F-G). (G) Magnification of the framed area in (F). Immunostaining for β gal is shown in red. GFP⁺ cells, visualized directly under a fluorescence microscope, are shown in green. DAPI counterstaining (blue) is present in all fluorescent panels except in the β gal picture in (E), as the low β gal signal was masked by the DAPI counterstaining. Arrowheads and arrows point to GFP⁺ cells that do not express β gal, located in the dermis or around the hair follicles, respectively. Section thickness: 10 μ m (A–C), 1 μ m (D–G). Bars: 150 μ m (A–C, E), 50 μ m (D, F), 40 μ m (G).

The $Pax3^{GFP}$ allele allows enrichment in melanocytes from skin cell suspensions through Fluorescent Activated Cell Sorting

Primary cultures of melanocytes from skin suspensions are usually contaminated with fibroblasts and keratinocytes. We tested whether the $Pax3^{GFP}$ allele could be used to enrich primary cultures in melanocytes. For this purpose, we compared primary cultures of skin cells either submitted or not submitted to fluorescent activated cell sorting (FACS) for GFP.

Cell suspensions from epidermis or dermis of $Pax3^{GFP/+}$ mice were plated without feeder cells in a melanocyte differentiation medium. The corresponding cultures contained cells that expressed the GFP reporter gene; the GFP signal was strong in the nucleus, and fainter in the cytoplasm (Figure 3A). The GFP⁺ cells were

refractive, had a fusiform shape typical of pigment cells, and overlaid GFP-negative (GFP[−]) cells (Figure 3A). The GFP[−] cells invaded the cultures during the first 2 weeks and were eliminated by G418 treatment. Within 3 weeks, the cultures contained GFP⁺ cells only, all of them pigmented (Supporting Information Figure S4A).

When skin cell suspensions were submitted to FACS for GFP, the GFP⁺ cells were clearly distinguished (Figure 3C–D). After FACS, GFP[−] and GFP⁺ cells were seeded independently at the same density in a melanocyte differentiation medium without feeder cells. We observed a high rate of mortality the day after plating so that the initial density of cells adhering to the dishes was low (Figure 3B,E). Cells from embryonic skin had a higher survival rate than cells from neonatal skin. Cells sorted as GFP[−] resembled keratinocytes and fibroblasts,

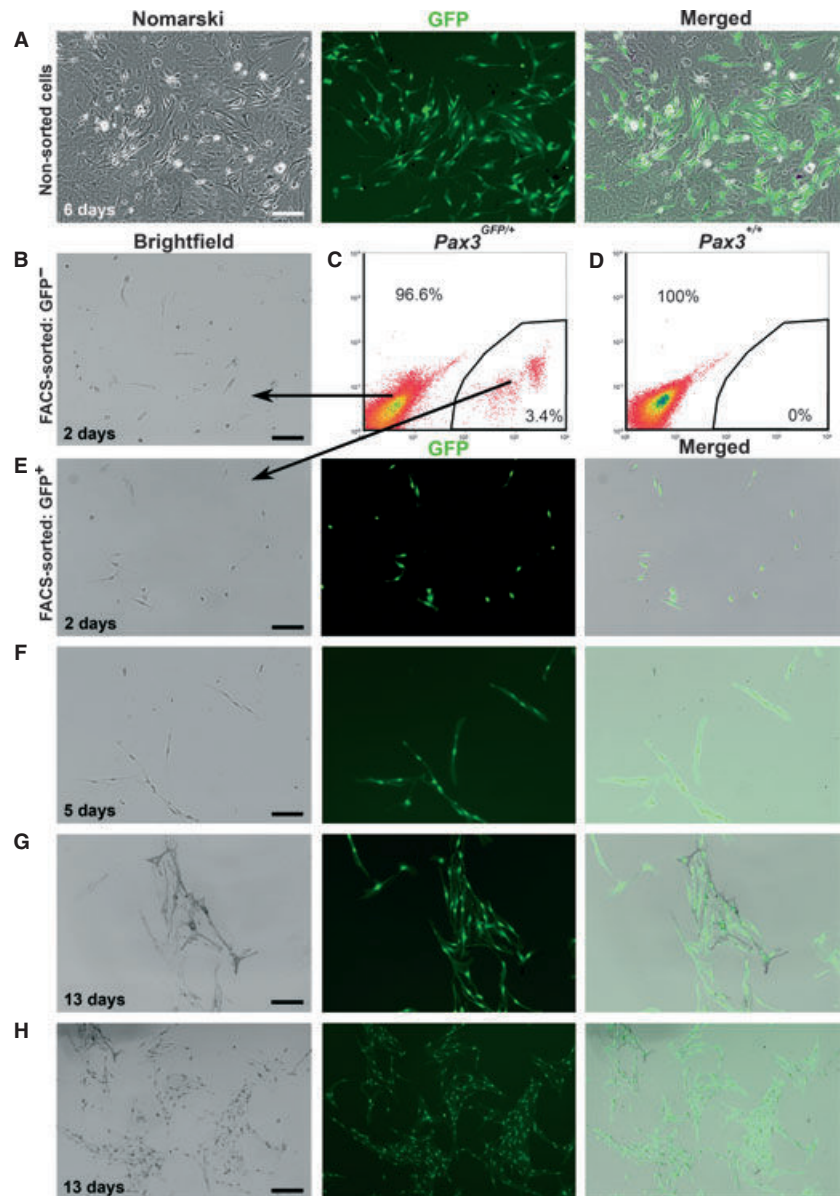


Figure 3. Enrichment in melanocytes through fluorescent activated cell sorting of GFP-positive cells from *Pax3^{GFP/+}* skin. Skin suspensions from *Pax3^{GFP/+}* mice were seeded in a melanocyte differentiation medium without feeder cells either directly (A) or after FACS-sorting of GFP⁺ cells (B,E-H). (A) Aspect of a culture of dermal cells from *Pax3^{GFP/+}* mice at P4, 6 days after seeding, without FACS. The culture is a mixture of GFP⁺ and GFP⁻ cells. (C,D) FACS dot plots of cells isolated from *Pax3^{GFP/+}* (C) and *Pax3^{+/+}* (D) skin at E18.5. Fluorescence observed on the FITC channel (x-axis) shows GFP⁺ cells only in the *Pax3^{GFP/+}* cell population. (B,E-H) Aspect of cultures of the cells sorted in (C) as GFP⁻ (B) or GFP⁺ (E-H). The time after seeding (2, 5 and 13 days) is indicated in the bottom left corner of the brightfield picture. Note the difference in aspect of the cells sorted as GFP⁻ (B) and GFP⁺ (E) 2 days after seeding. The GFP⁺ cells are initially small, with a fusiform shape and no pigment; all of them express GFP (E). Cells in the culture gradually become bigger (F,G), more dendritic and pigmented (G,H) and their density increases rapidly (E-H). All of them express GFP (G,H). Bars: 100 μ m (A,B,E-G); 200 μ m (H).

did not express the GFP reporter gene (Figure 3B) and died within a few days. Conversely, cells sorted as GFP⁺ survived as GFP⁺, spindle-shaped, refractive and unpigmented cells. Initially scattered as single cells in the dishes (Figure 3E), they gave small clones within 5 days and clones of several tens of cells within 2 weeks (Figure 3F-H). The cells continued to express the GFP reporter gene after several weeks in culture. The GFP signal was specific as no GFP⁺ cell was observed in cultures of skin cells from *Pax3^{+/+}* mice (Figure S4B-C). To ensure the GFP⁺ cells were melanocytes, we observed their pigmentation and tested whether they expressed markers of the melanocyte lineage. Pigment appeared after 1 week and most GFP⁺ cells were pigmented after 2 weeks. In addition, the cultured cells expressed PAX3 and DCT (Figure S4D-E).

These data show that primary cultures from skin suspensions of *Pax3^{GFP/+}* mice can be enriched in melanocytes by FACS of GFP⁺ cells.

In the skin of *Pax3^{GFP/+}* mice, pigment cells express a high level of GFP

Fluorescent activating cell sorting of GFP⁺ cells revealed that epidermal suspensions contained cells either expressing high levels of GFP (GFP^{high}), or no GFP (Supporting Information Figure S5B); the dermal cell suspensions gave a third, intermediate population of GFP⁺ cells (GFP^{low}) (Figure S5C). The percentages of GFP^{high} and GFP^{low} cells within the sorted populations were variable, depending on the experiment, the embryonic or neonatal stage, and origin, epidermal or dermal. Figure S5A-C presents results of a typical experiment.

We tested whether GFP^{low} dermal cells had the same potential as GFP^{high} cells to differentiate into melanocytes in vitro. We FAC sorted the cells of epidermis and dermis from *Pax3*^{GFP/+} mice. When seeded, GFP^{high} cells, either epidermal or dermal, gave numerous clones that contained exclusively melanocytes, whereas GFP^{low} dermal cells hardly adhered. Among the adherent GFP^{low} cells, none differentiated into a melanocyte; they did not grow and eventually died within a few weeks. Thus, under our culture conditions, the GFP^{low} dermal cells had no ability to differentiate into melanocytes.

To confirm that the GFP^{low} population contained no pigment cells, we FACS sorted the cells of epidermis and dermis from *Pax3*^{GFP/+}; *Kit*^{W-v/W-v}, melanocyte-deficient mice (Supplementary Figure S5D–E). Epidermal cell suspensions yielded only a few GFP^{high} cells that gave no, one or two clones of melanocytes in vitro, in three independent experiments. The dermal cell suspensions contained only GFP^{low} cells that did not grow and died within a few weeks in the melanocyte differentiation medium.

These data suggest that the skin of *Pax3*^{GFP/+} mice contains two populations of GFP⁺ cells that differ in the level of GFP expression and that pigment cells are GFP^{high}.

In the last few years, many reporters for pigment cells have been produced. In addition to the seminal reporter *Tg(Dct::lacZ)* (Mackenzie et al., 1997) and its yellow version *Tg(Dct::Venus)* (Aoki et al., 2011), conditional systems such as *Tg(Tyr::Cre)*; *R26YFP*, *Dct*^{tm1(Cre)Bee}; *CAG-CAT-EGFP* or *Tg(Tyr::Cre)*; *Z/EG* (Aoki et al., 2011; Colombo et al., 2012; Mort et al., 2010; Nishikawa-Torikai et al., 2011) and inducible systems including *Tg(Tyr::Cre-ERT2)*; *Rosa26-LSL-GFP*, *Tg(Tyr::Cre-ERT2)*; *Rosa26-LSL-βgal*, *Tg(Dct::rtTA)*; *Tg(TRE::lacZ)* and *Tg(Dct::rtTA)*; *Tg(TRE::H2BGFP)* (Monahan et al., 2010; Woods and Bishop, 2011; Zaidi et al., 2011) have been developed and successfully used to label pigment cells. All these systems rely on *Tyr* or *Dct* promoters to drive expression of the reporter gene in pigment cells. *Pax3*^{GFP} offers an interesting alternative. First, it is a straightforward system with regard to breeding schemes and selection of *Pax3*^{GFP/+} mice without genotyping. Second, the fluorescence conferred by the *Pax3*^{GFP} allele is directly observable, bright and stable. Third, pigment cells at every differentiation stage, including MSCs, are strongly labelled. Last, *Pax3*^{GFP} is suitable for fluorescent-activated cell sorting of melanoblasts and melanocytes that can be grown as pure cultures.

In the dermis, cells of the Schwann cell lineage express the *Pax3*^{GFP} allele

In the dermis of embryonic and postnatal mice, we observed GFP⁺ cells that were not pigment cells. To characterize these cells, we performed immunofluorescence against markers for the major dermal cell types, fibroblasts, muscle cells, neurons and Schwann cells. The GFP⁺ cells in the dermis were not labelled with

antibodies against desmin, Paired-box transcription factor 7 (PAX7) or smooth muscle actin (SMA) (data not shown), suggesting that they were not fibroblasts or muscle cells. They did not express the structural marker for neurons, neurofilament M (NFM). GFP⁺ cells that co-expressed SOX10 and the low affinity nerve growth factor receptor, p75^{NTR}, were observed adjacent and parallel to the basal membrane of the epidermis and HFs (Figure 4A–C). GFP⁺ cells in the dermis also expressed S100 protein (Figure 4D,E).

These data suggest that in the dermis of *Pax3*^{GFP/+} mice, there is a subpopulation of GFP⁺ cells that does not belong to the pigment cell lineage. Their distribution corresponds to that reported for Schwann cells within cutaneous nervous plexuses (Botchkarev et al., 1997). They expressed SOX10 and p75^{NTR}, two markers of neural crest cells, Schwann cell precursors and immature Schwann cells, and S100, which is known to be expressed in immature, non-myelinated and myelinated Schwann cells (Jessen and Mirsky, 2005). Previous reports showed that PAX3 is expressed in immature Schwann cells; it is downregulated in myelinating Schwann cells and exerts a negative effect on myelin differentiation (Jessen and Mirsky, 2005). Moreover, PAX3 functions both in establishing and maintaining the S100⁺ phenotype in Schwann cells (Kioussi et al., 1995). Altogether, our results strongly suggest that PAX3 is expressed in immature or nonmyelinating Schwann cells of the skin nerve fibers.

Interestingly, during development, Schwann cell precursors along peripheral nerves are a cellular source of melanoblasts in the ventral pathway (Adameyko and Lallemand, 2010), emphasizing the ontologic relationship between pigment cells and Schwann cells. In humans, p75⁺ multipotent dermal stem cells, which have been isolated from the dermal region of neonatal foreskin, are able to differentiate into many neural crest derivatives, including Schwann cells and melanocytes (Zabierowski et al., 2011b). *Pax3*^{GFP} would be a useful tool to test whether the GFP⁺, SOX10⁺, p75⁺ dermal cells found in mouse skin do have such a potential.

In hair follicles, nestin-positive cells in the piloneural collar receptors express the *Pax3*^{GFP} allele

Additional GFP⁺ cells were observed around the HF, above the bulge, in *Pax3*^{GFP/+} (Figure 5) and *Pax3*^{GFP/+}; *Kit*^{W-v/W-lacZ} mice (Supporting Information Figure S6), implying that they were not pigment cells. These cells had a peculiar shape: their cellular bodies were above the bulge and they exhibited long finger-like processes extending upwards into the isthmus (Figure 5, arrows). They formed a crown surrounding the whole HF (Figures 5B and S6B). In *Pax3*^{GFP/+}; *Tg(Dct::lacZ)* mice, they could easily be distinguished from the GFP⁺ pigment cells as they did not express βgal (DCT) (Figure 2E–G). Double immunofluorescence confirmed that these GFP⁺ cells expressed PAX3 (Figure S6C). Keratin 5 and laminin

Figure 4. GFP-positive cells in the dermis express markers of neural crest cells or Schwann cells. Immunostaining on transverse sections of the back skin from a *Pax3^{GFP/+}* embryo at E16.5 (A,B,D,E) and a *Pax3^{GFP/+}* mouse at P8 (C). (A–C) Triple immunostaining against GFP (green), SOX10 (purple) and p75 (red); blue: DAPI counterstaining. In the dermis, white arrowheads point to GFP⁺, SOX10⁺, p75⁺ triple-labelled cells; arrows to GFP⁺, p75⁺ double-labelled cells; red arrowheads to GFP⁺, SOX10⁺, p75⁺ cells. In the epidermis, the GFP⁺ cells are SOX10⁺, p75⁺. (D,E) Double immunostaining against GFP (green) and S100 (orange). In the dermis, GFP⁺, S100⁺ double-labelled cells either form a network (D) or are isolated (E). Green arrowheads point to small, isolated GFP⁺, S100⁺ cells in (D). Section thickness: 1 μ m. Bars: 50 μ m (A,D), 20 μ m (B,C,E).

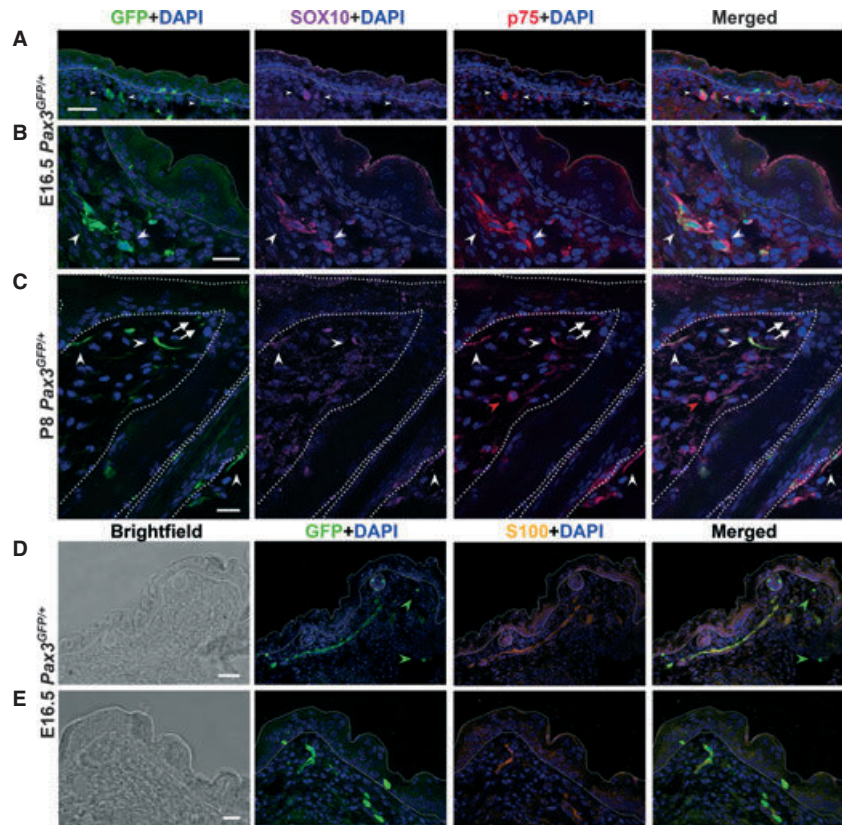
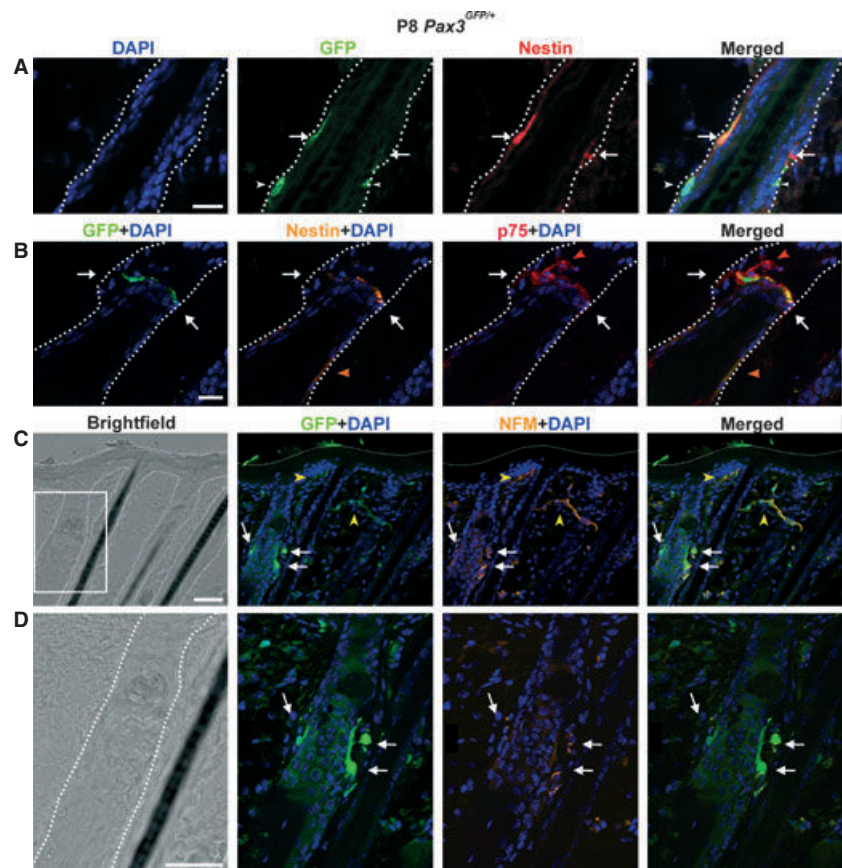


Figure 5. GFP-positive cells with a dendrite-like structure found within the lower permanent part of *Pax3^{GFP/+}* hair follicles express markers of skin multipotent stem cells. Immunostaining on transverse sections of the back skin from *Pax3^{GFP/+}* mice at P8, against GFP (green) and nestin (red) on a zig-zag hair follicle (A); against GFP (green), nestin (orange) and p75 (red) on a zig-zag hair follicle (B); against GFP (green), and NFM (orange) on a zig-zag hair follicle (C,D); (D) is a magnification of the framed panel in (C). Blue: DAPI counterstaining of nuclei. White arrowheads point to GFP⁺ only cells; arrows to GFP⁺ cells with a dendrite-like structure that express nestin and p75 (A,B) but not NFM (C,D), even though they are in direct contact with NFM-expressing cells; orange arrowheads point to GFP⁺, nestin⁺, p75⁺ cells; red arrowheads to GFP⁺, nestin⁺, p75⁺ cells; yellow arrowheads to GFP⁺, NFM⁺ cells surrounded by NFM⁺ nerve fiber bundles. Section thickness: 1 μ m. Bars: 20 μ m (A,B), 50 μ m (C,D).



immunolabellings showed that these GFP⁺ cells were within the HF, between the basal membrane and the keratin 5-expressing keratinocytes forming the ORS (Figure S6D,E).

Cells with such characteristics have been reported by several authors under different names: cells forming the Follicular Neural Network B (FNB) (Botchkarev et al., 1997), nestin-positive, multipotent stem cells (Li et al., 2003), and nestin-positive type II terminal Schwann cells (tIISCs) of the piloneural collar receptors (Woo et al., 2012). In vitro, the nestin-positive, multipotent stem cells from the bulge-isthmus region of HFs can differentiate into neurons, glia, keratinocytes, smooth muscle cells or melanocytes (Amoh et al., 2005). The piloneural collar comprises a variety of sensory afferent and terminal Schwann cells that innervate a region of the HF below the sebaceous gland and function as mechanoreceptors (Woo et al., 2012). Double immunolabelling on skin sections from *Pax3^{GFP/+}* mice showed that the GFP⁺ cells within the bulge-isthmus area strongly expressed nestin (Figures 5A–B and S6F). The GFP⁺, nestin⁺ cells also expressed p75^{NTR} (Figure 5B). Thus, they expressed markers of tIISCs. They were closely associated with NFM-positive terminal nerve endings (Figure 5C–D). Interestingly, the GFP⁺, nestin⁺ cells were clearly separated from the GFP⁺, nestin[−] pigment cells: the former had their cellular bodies in the uppermost part of the bulge area, whereas the latter were located further down (Figures 2G and 5A).

The skin multipotent stem cells and the tIISC of the piloneural collar receptors were characterized independently, although they share histological characteristics and markers. We propose that these cells may represent a single cell type that we call nestin⁺ cells of the piloneural collars. When we FAC-sorted skin cells from *Pax3^{GFP/+}; Kit^{W-v/W-v}* mice, we could recover only the dermal GFP^{low} population that could not differentiate into melanocytes under our experimental conditions. We conclude that the nestin⁺ cells of the piloneural collars are recovered in the GFP^{low} population and that they have a poor capacity, if any, to differentiate into melanocytes in vitro. In favour of this hypothesis, the nestin⁺ stem cells described by Amoh and colleagues had a poor potential to differentiate into melanocytes in vitro, as only 2% of them could give melanocytes after 2 months in culture (Amoh et al., 2005).

The bulge area accommodates several populations of stem cells including PAX3⁺, nestin[−], DCT⁺ MSCs (Osawa et al., 2005), PAX3⁺, nestin⁺ skin multipotent cells/tIISCs (Amoh et al., 2005; Woo et al., 2012), PAX3[−] nestin⁺ epidermal neural crest stem cells (Hu et al., 2006), and K15⁺, CD34⁺ epidermal keratinocyte stem cells (Ohshima, 2007). Except for the epidermal keratinocyte stem cells, all stem cells present in the bulge-isthmus can differentiate in vitro into melanocytes. Relationships between the various types of stem cells are poorly documented. Factors secreted in

the niche environment may restrict the potential of multipotent stem cells. In this view, MSCs may constitute a fate-restricted stem cell population derived from stem cells with a broader potential. Conversely, in the proper environment, MSCs may be able to 'de-differentiate' into multipotent stem cells. Interestingly, melanocytes can be reprogrammed in vitro to neural crest stem-like cells (Zabierowski et al., 2011a) and melanoblasts isolated from embryonic and neonatal skin can generate neurons, glial cells, smooth muscle cells and melanocytes (Motohashi et al., 2009). The *Pax3^{GFP}* allele may thus be a valuable tool to label subpopulations of stem cells in the bulge-isthmus region to study stem cell plasticity and interactions.

Methods

Mice and genotyping

C57BL/6J-*Tg(Dct::lacZ)A12Jkn* (referred to as *Tg(Dct::lacZ)*) mice were a kind gift from Ian Jackson (Western General Hospital, Edinburgh) (Mackenzie et al., 1997). *Pax3^{tm4Buck}* mice (referred to as *Pax3^{GFP/+}*) were produced at the Pasteur Institute (Relaix et al., 2005) and backcrossed onto the C57BL/6J background for more than 15 generations. Transgenic C57BL/6J-*Kit^{tm1Alf/+}* mice (referred to as *Kit^{W-lacZ/+}* mice) were generated at the Alfort Veterinary School (Bernex et al., 1996). 129/Sv-*Kit^{W-v/+}* mutant mice were bred in this facility. Animal care and use for this study were approved by the ethical board of Alfort Veterinary School in accordance with European Union Standards.

Genotyping methods are detailed in Supporting Information Data S1.

Sample preparation and sectioning

For GFP detection and anti-βgal immunofluorescence, embryos and postnatal skins were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C for 20–45 min depending on embryonic stage or tissue thickness. Hair follicles were isolated from skin samples using fine syringe needles and were mounted in Mowiol (Polysciences Europe, Eppenheim, Germany). For cryostat sectioning, samples were embedded in Tissue-Tek OCT Compound (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), frozen in liquid nitrogen and 10 μm cryostat sectioned. Four mutants and two control littermates were analyzed in each experiment.

For double immunostaining, the skin from P8 mice was fixed overnight at 4°C in 0.5% PFA, then washed at 4°C in 4% sucrose, cryopreserved overnight at 4°C in 15% sucrose in PBS, then incubated for 2 h at 40°C in 15% sucrose, 7% gelatin in PBS and finally embedded in 15% sucrose, 7% gelatin in PBS, frozen in liquid nitrogen and 14 μm sections made with a cryostat.

For fluorescent cell sorting, skins from 3 to 5 age-matched *Pax3^{GFP/+}* and 3 to 5 *Pax3^{+/+}* littermates were collected in ice-cold PBS. Fat and underlying subcutis were removed with a scalpel blade. The skins were incubated overnight at 4°C in 0.5% trypsin/0.2% EDTA in PBS (PAA, Les Mureaux, France). Dermis and epidermis were separated and dermis samples were incubated for 30 min at 37°C in 10 mg/ml collagenase type IV (Gibco Invitrogen Cell Culture, Cergy Pontoise, France). The samples were neutralized in RPMI medium containing 10% FCS then chopped with a scalpel blade until cell suspensions were obtained. The cell suspensions were filtered first through a 70 μm-, then through a 35 μm cell strainer (Beckton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France).

Immunofluorescence

The primary antibodies used in this study and their working dilutions are listed in Supplementary Table S1. Immunostaining methods are detailed in the Supplementary Material section.

Fluorescent activated cell sorting

Cell suspensions from *Pax3^{GFP/+}* and *Pax3^{+/-}* skins were counted, centrifuged and re-suspended in RPMI 1640/2mM EDTA. Propidium iodide was added to the suspensions just before cell sorting. All acquisitions and data analyses were performed with a MoFlo XDP Flow Cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) interfaced to the FLOWJO software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Cells were gated for single events and viability and then sorted according to their GFP expression. *Pax3^{+/-}* skin suspensions were used as negative controls. At least three independent experiments were performed for each time point.

Cell cultures

Cell suspensions from mouse skin and FAC sorted cells were centrifuged and plated without feeder cells at a density of between 10^4 and 2.10^4 cells/ml in a melanocyte-differentiating medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 10^3 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 10 ng/ml Recombinant Mouse Stem Cell Factor (R&D Systems, Lille, France), 10 nM Endothelin 1 (Sigma-Aldrich, Lyon, France), 10 nM cholera toxin and 200 nM 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) (Sigma-Aldrich, Lyon, France). The cells were grown at 37°C under 5% CO₂ at pH 7.0–7.1. The medium was changed twice weekly and the cells were subcultured when reaching subconfluence. For immunofluorescence, the cells were plated onto coverslips at a density of 5.10^4 cells/ml.

Image acquisition

Brightfield and fluorescent microscopy was performed with a Zeiss Axioplan 2 Imaging microscope with ApoTome™ (Zeiss, Oberkochen, Germany) using Plan-NEOFLUAR. Images were acquired with an Axiocam MRm (fluorescence imaging) camera (Zeiss) coupled with Zeiss AXIOVISION 4.4 software. Minimal image processing was performed with Adobe PHOTOSHOP.

Acknowledgements

We thank Prof. V. Hearing and Prof. I. Jackson for the generous gift of the α PEP8 anti-DCT antibody and the *Tg(Dct::lacZ)* mouse line, respectively. The nestin (Rat-401) IgG1, neurofilament M (2H3) IgG1, Paired-box transcription factor 3 IgG2a, Paired-box transcription factor 7 IgG1, developed respectively by S. Hockfield, T.M. Jessell and J. Dodd, C.P. Ordahl, and A. Kawakami, were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, set up under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. We are particularly grateful to Dr A. Jory for the protocol for double immunofluorescence against PAX3 and GFP and to Prof. D. Bennett for advice on melanocyte culture without feeder cells. We wish to thank A. Casanova, C. Koenen and P. Wiart for dedicated animal husbandry; P. Salaün for technical help; E. Perret and M. A. Nicola from the Plateforme d'Imagerie Dynamique at Pasteur Institute for help in imaging; G. Czerw for help in artwork; A. El-Amraoui for helpful discussion; M. Chodkiewicz for critical reading or the manuscript. This work was supported in part by the OICNM Research grant to the Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. J.D.Z., S.G., F.B., J.J.P. and G.A.H. were supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) (grants 4332, 99/7468 and 1002) and by an agreement between INRA and the Pasteur Institute; J.J.P. by the 'Cellules Souches' Grand Programme Horizontal of

the Pasteur Institute. J.D.Z. and C. C. were funded by the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (France).

References

- Adameyko, I., and Lallemand, F. (2010). Glial versus melanocyte cell fate choice: Schwann cell precursors as a cellular origin of melanocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 3037–3055.
- Adameyko, I., Lallemand, F., Aquino, J.B. et al. (2009). Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* **139**, 366–379.
- Amoh, Y., Li, L., Katsuoka, K., Penman, S., and Hoffman, R.M. (2005). Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5530–5534.
- Aoki, H., Hara, A., Motohashi, T., Osawa, M., and Kunisada, T. (2011). Functionally distinct melanocyte populations revealed by reconstitution of hair follicles in mice. *Pigment Cell Melanoma Res.* **24**, 125–135.
- Bernex, F., De Sepulveda, P., Kress, C., Elbaz, C., Delouis, C., and Panthier, J.J. (1996). Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in *W^{lacZ/+}* and *W^{lacZ/W^{lacZ}}* mouse embryos. *Development* **122**, 3023–3033.
- Bondurand, N., Pingault, V., Goerich, D.E., Lemort, N., Sock, E., Le Caignec, C., Wegner, M., and Goossens, M. (2000). Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1907–1917.
- Botchkarev, V.A., Eichmüller, S., Johansson, O., and Paus, R. (1997). Hair cycle-dependent plasticity of skin and hair follicle innervation in normal murine skin. *J. Comp. Neurol.* **386**, 379–395.
- Cable, J., Jackson, I.J., and Steel, K.P. (1995). Mutations at the *W* locus affect survival of neural crest-derived melanocytes in the mouse. *Mech. Dev.* **50**, 139–150.
- Colombo, S., Champeval, D., Rambow, F., and Larue, L. (2012). Transcriptomic analysis of mouse embryonic skin cells reveals previously unreported genes expressed in melanoblasts. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 170–178.
- Epstein, D.J., Vogan, K.J., Trasler, D.G., and Gros, P. (1993). A mutation within intron 3 of the *Pax-3* gene produces aberrantly spliced mRNA transcripts in the *sploch* (*Sp*) mouse mutant. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 532–536.
- Galibert, M.D., Yavuzer, U., Dexter, T.J., and Goding, C.R. (1999). *Pax3* and regulation of the melanocyte-specific tyrosinase-related protein-1 promoter. *J. Biol. Chem.* **274**, 26894–26900.
- Goulding, M.D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J.R., and Gruss, P. (1991). *Pax-3*, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J.* **10**, 1135–1147.
- Hornyak, T.J. (2006). The developmental biology of melanocytes and its application to understanding human congenital disorders of pigmentation. *Adv. Dermatol.* **22**, 201–218.
- Hornyak, T.J., Hayes, D.J., Chiu, L.Y., and Ziff, E.B. (2001). Transcription factors in melanocyte development: distinct roles for *Pax-3* and *Mitf*. *Mech. Dev.* **101**, 47–59.
- Hou, L., Panthier, J.J., and Arnheiter, H. (2000). Signaling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interactions between KIT and MITF. *Development* **127**, 5379–5389.
- Hu, Y.F., Zhang, Z.J., and Sieber-Blum, M. (2006). An epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) molecular signature. *Stem. Cells* **24**, 2692–2702.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 671–682.
- Kioussi, C., Gross, M.K., and Gruss, P. (1995). *Pax3*: a paired domain gene as a regulator in PNS myelination. *Neuron* **15**, 553–562.
- Kubic, J.D., Young, K.P., Plummer, R.S., Ludvik, A.E., and Lang, D. (2008). Pigmentation PAX-ways: The role of *Pax3* in

- melanogenesis, melanocyte stem cell maintenance, and disease. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21, 627–645.
- Lang, D., Lu, M.M., Huang, L., Engleka, K.A., Zhang, M., Chu, E.Y., Lipner, S., Skoultschi, A., Millar, S.E., and Epstein, J.A. (2005). Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature* 433, 884–887.
- Li, L., Mignone, J., Yang, M., Matic, M., Penman, S., Enikolopov, G., and Hoffman, R.M. (2003). Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9958–9961.
- Mackenzie, M.A., Jordan, S.A., Budd, P.S., and Jackson, I.J. (1997). Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 192, 99–107.
- Monahan, K.B., Rozenberg, G.I., Krishnamurthy, J., Johnson, S.M., Liu, W., Bradford, M.K., Horner, J., Depinho, R.A., and Sharpless, N.E. (2010). Somatic p16(INK4a) loss accelerates melanomagenesis. *Oncogene* 29, 5809–5817.
- Mort, R.L., Hay, L., and Jackson, I.J. (2010). Ex vivo live imaging of melanoblast migration in embryonic mouse skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23, 299–301.
- Motohashi, T., Yamanaka, K., Chiba, K., Aoki, H., and Kunisada, T. (2009). Unexpected multipotency of melanoblasts isolated from murine skin. *Stem Cells* 27, 888–897.
- Muller-Rover, S., Handjiski, B., Van Der Veen, C., Eichmuller, S., Foitzik, K., McKay, I.A., Stenn, K.S., and Paus, R. (2001). A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J. Invest. Dermatol.* 117, 3–15.
- Nishikawa, S., and Osawa, M. (2007). Generating quiescent stem cells. *Pigment Cell Res.* 20, 263–270.
- Nishikawa-Torikai, S., Osawa, M., and Nishikawa, S. (2011). Functional characterization of melanocyte stem cells in hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* 131, 2358–2367.
- Nishimura, E.K., Jordan, S.A., Oshima, H., Yoshida, H., Osawa, M., Moriyama, M., Jackson, I.J., Barrandon, Y., Miyachi, Y., and Nishikawa, S. (2002). Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 416, 854–860.
- Nocka, K., Tan, J.C., Chiu, E., Chu, T.Y., Ray, P., Traktman, P., and Besmer, P. (1990). Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W. *EMBO J.* 9, 1805–1813.
- Ohyama, M. (2007). Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J. Dermatol. Sci.* 46, 81–89.
- Osawa, M., Egawa, G., Mak, S.S., Moriyama, M., Freter, R., Yonetani, S., Beermann, F., and Nishikawa, S. (2005). Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche. *Development* 132, 5589–5599.
- Potterf, S.B., Furumura, M., Dunn, K.J., Arnheiter, H., and Pavan, W.J. (2000). Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. *Hum. Genet.* 107, 1–6.
- Relaix, F., Polimeni, M., Rocancourt, D., Ponzetto, C., Schafer, B.W., and Buckingham, M. (2003). The transcriptional activator PAX3-FKHR rescues the defects of Pax3 mutant mice but induces a myogenic gain-of-function phenotype with ligand-independent activation of Met signaling in vivo. *Genes Dev.* 17, 2950–2965.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435, 948–953.
- Sommer, L. (2011). Generation of melanocytes from neural crest cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 411–421.
- Watanabe, A., Takeda, K., Ploplis, B., and Tachibana, M. (1998). Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. *Nat. Genet.* 18, 283–286.
- Woo, S.H., Baba, Y., Franco, A.M., Lumpkin, E.A., and Owens, D.M. (2012). Excitatory glutamate is essential for development and maintenance of the piloneural mechanoreceptor. *Development* 139, 740–748.
- Woods, S.L., and Bishop, J.M. (2011). A new transgenic mouse line for tetracycline inducible transgene expression in mature melanocytes and the melanocyte stem cells using the Dopachrome tautomerase promoter. *Transgenic Res.* 20, 421–428.
- Zabierowski, S.E., Baubet, V., Himes, B. et al. (2011a). Direct reprogramming of melanocytes to neural crest stem-like cells by one defined factor. *Stem Cells* 29, 1752–1762.
- Zabierowski, S.E., Fukunaga-Kalabis, M., Li, L., and Herlyn, M. (2011b). Dermis-derived stem cells: a source of epidermal melanocytes and melanoma? *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 422–429.
- Zaidi, M.R., Hornyak, T.J., and Merlino, G. (2011). A genetically engineered mouse model with inducible GFP expression in melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 393–394.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. (A) Phenotype of a C57BL/6J-Pax3^{GFP/+} mouse at 3 months.

Figure S2. Immunostaining against PAX3 and GFP on optical transverse sections of the truncal back skin from Pax3^{GFP/+} embryos at E12.5.

Figure S3. (A) Phenotype of (left) a *Kit*^{W-v/W-v}; Pax3^{GFP/+} mouse next to a *Kit*^{W-v/+}; Pax3^{GFP/+} littermate on a C57BL/6J-129/Sv mixed background at 3½ months; (right) a *Kit*^{W-v/W-lacZ}; Pax3^{GFP/+} mouse next to a *Kit*^{+/+}; Pax3^{GFP/+} littermate on a C57BL/6J-129/Sv mixed background at P8.

Figure S4. Skin suspensions from neonatal mice were seeded in a melanocyte differentiation medium without feeder cells either directly (A,B) or after FACS sorting of GFP⁺ cells (C–E).

Figure S5. FACS dot plots of cells isolated from *Kit*^{+/+}; Pax3^{+/+} (A), *Kit*^{+/+}; Pax3^{GFP/+} (B–C).

Figure S6. Transverse sections of the skin from Pax3^{GFP/+}; *Kit*^{W-v/W-lacZ} mice at P8 (1st hair cycle).

Table S1. List of primary antibodies used for immunofluorescence.

Data S1. Material.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary methods

Genotyping

To identify the *Tg(Dct::lacZ)* transgene, PCR was performed as described previously (Takemoto et al., 2006). To identify the *Pax3^{GFP}* transgene, the *GFP* sequence was amplified using the following primers: *GFP* forward: 5'-ttgtggcggatcttgaagttcaccttgatgc-3'; *GFP* reverse: 5'-acatgaagcagcagcacttcttcaagtccg-3'. PCR conditions were 30 s at 94°C, 30 s at 57°C, 40 s at 72°C for 35 cycles and a final extension step at 72°C for 10 min. The primers used to identify the *lacZ* sequence in *Kit^{W-lacZ/+}* mice were: *lacZ* forward: 5'-gacaccagaccaactggtaatgtagcgac-3'; *lacZ* reverse: 5'-gcatcgagctgggtaataagcgttggaat-3'. PCR conditions were 30 s at 94°C, 30 s at 60°C, 90 s at 72°C for 35 cycles, and a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR fragments were 270 bp and 822 bp long for *GFP* and *lacZ* respectively. To identify the *Kit^{W-v}* allele, *Kit* sequences were amplified using the following primers: *Kit* forward: 5'-gatttgggaacctcacaaactgttg-3'; *Kit* reverse 5'-gcttatgccatttaagggggagagt-3'. PCR conditions were 30 s at 94°C, 30 s at 65°C, 1 min at 72°C for 35 cycles, and a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR fragment was 822 bp long and was centered on the C to T transition specific for the *Kit^{W-v}* mutation (Nocka et al., 1990). The PCR fragment was digested with *NsiI* which split the *Kit^{W-v}* allele into only two fragments of 389 bp and 493 bp.

Immunofluorescence

Immunostainings for detection of β -gal, DCT, K5, NFM, laminin, SMA and PAX7 was performed as follows: cryostat sections were fixed for 10 min in acetone and rinsed in PBS. Blocking was performed for 1h at room temperature (RT) in 10% normal goat serum in PBS except for SMA and PAX7 immunostaining where the M.O.M blocking reagent (Vector Laboratories, Peterborough, England) was used according to the manufacturer's instructions. Sections were incubated overnight at 4°C in the primary antibody solution in 10% normal goat serum in PBS, then 1h at RT in 1:500 goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor solution (InVitrogen, France) in PBS.

Detection of PAX3, S100, nestin and desmin required an unmasking step during which the GFP fluorescent signal was lost. Thus double immunostaining for GFP and either PAX3, S100 and desmin were performed. The general protocol for double immunostaining was as follows: cryostat sections were rinsed in PBS. Blocking was performed for 1h at RT in 10% normal goat serum, 0.1% Tween-20 in PBS (PBST) except for nestin and desmin immunostaining where the M.O.M blocking reagent was used. Sections were incubated overnight at 4°C in anti-GFP antibody solution in PBST, washed in PBST, incubated for 1h at RT in goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (InVitrogen, France) diluted 1:500 in PBS and postfixed in 0.1% PFA for 10 min. Permeabilisation was performed in 0.1% Triton

X-100 in PBS at 4°C for 20 min. After 7 min in a boiling 10 mM Sodium Citrate Buffer pH6 unmasking solution, sections were incubated for a minimum of 2h at 4°C in 1% BSA, 10% normal goat serum in PBS. Sections were then incubated overnight at 4°C in the anti-nestin, anti-desmin or anti-S100 solution, washed several times for 10 min in PBST and once in PBS, and incubated for 1h at RT in 1:500 Alexa Fluor 555 solution (Invitrogen, France) in PBS. Double immunostaining for detection of GFP and PAX3 required the addition of a biotin-streptavidin amplification step after incubation in the first antibody solutions: the sections were incubated for 45 min at RT in biotinylated anti-mouse IgG solution (Vector Laboratories, Peterborough, England) 1:1000 in 1% BSA 2% normal goat serum in PBS, washed several times for 10 min in PBST and once in PBS, and incubated for 45 min at RT in streptavidin Alexa Fluor 555 serum (Invitrogen, France). Double immunostainings for detection of SOX10 and p75^{NTR} did not require any unmasking step; permeabilization was performed in 0.1% Triton X-100, 0.1% BSA and 0.15% glycine in PBS at 4°C for 20 min; incubation in the first antibody solution was performed in a single step with both anti-SOX10 and anti-p75^{NTR}, not sequentially.

Immunofluorescence of cells grown on coverslips was performed as follows. Cells were fixed for 15 min in 4% PFA and rinsed 3 times for 5 min in PBS. The cells were permeabilised for 10 min at RT in 0.1% Triton X-100 in PBS. Blocking was performed for 1h at RT in 10% normal goat serum in PBS. The coverslips were incubated overnight at 4°C in a solution containing both primary antibodies (GFP+TRP2 or GFP+PAX3) in 10% normal goat serum in PBS, washed 3 times for 5 min in PBS, then incubated 1h at RT in 1:400 secondary antibody solution, and washed 3 times for 5 min in PBS. Visualization of cell nuclei was achieved by incubating the sections for 2 min in a 1:4000 DAPI solution. The sections were then mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, England).

Supplementary Table S1 : List of primary antibodies used for immunofluorescence

Antigen (clone) IgG	Abbreviation	Host	Manufacturer (Catalog #)	Dilution
β-galactosidase IgG	βgal	Rabbit	Cappel (55976)	1:500
Desmin IgG2b		Mouse	Santa Cruz (sc-23879)	1:100
Dopachrome tautomerase IgG	DCT/TRP2	Rabbit	Vincent Hearing (aPEP8)	1:500
Green Fluorescent Protein IgG	GFP	Chicken	Abcam (ab13970)	1:400
Keratin 5 IgG	K5	Rabbit	Covance (PRB-160P)	1:1000
Laminin IgG		Rabbit	Sigma Aldrich (L9393)	1:500
Nestin (NS-1) IgG1		Mouse	DSHB	1:100
Neurofilament M (2H3) IgG1	NFM	Mouse	DSHB	1:4000
Low affinity nerve growth factor	p75	Rabbit	Abcam (ab8874)	1:300

receptor IgG

Paired-box transcription factor 3 IgG2a	PAX3	Mouse	DSHB	1:200
Paired-box transcription factor 7 IgG1	PAX7	Mouse	DSHB	1:50
S100 IgG	S100	Rabbit	Dako (Z0311)	1:200
Smooth muscle actin (1A4) IgG2a	SMA	Mouse	Dako (M0851)	1:50
SRY-box containing protein 10 (N-20) IgG	SOX10	Goat	Santa Cruz (sc-17342)	1:25

Supplementary Figure S1:

(A): Phenotype of a C57BL/6J-*Pax3*^{GFP/+} mouse at 3 months. (B): a *Pax3*^{GFP/+} embryo at E11. The strong GFP signal in the neural tube, dermomyotome and myotome of the somites, limb buds, fronto-nasal masses and olfactory epithelium hides the signal in individual melanoblasts in the skin. (C): Transverse sections of a vibrissa from a *Pax3*^{GFP/+} embryo at E16.5. Within the vibrissa, GFP⁺ cells can be found. The bright GFP signal in the dermis is responsible for the green color of the snout seen in (E). (D-E): Transverse sections of the eye (D) and of the inner ear (E) of a *Pax3*^{GFP/+} embryo at E14.5. GFP⁺ cells were visualized directly under the microscope. Dotted lines in (D) mark the limit between the choroid (C) and the retinal pigmentary epithelium (RPE). (F): Direct detection of GFP⁺ cells on the head of a *Pax3*^{GFP/+} mouse (left) and of a *Pax3*^{+/+} littermate (right) at P1. The strong and specific GFP signal in the snout allows identification of the *Pax3*^{GFP/+} pups. (G): Transverse sections of the back skin of a C57BL/6J-*Pax3*^{GFP/+} mouse (left) and of a C57BL/6J-*Pax3*^{+/+} littermate (right) at P8. GFP⁺ cells were visualized directly under the microscope. No GFP⁺ cells can be seen in the skin and HFs of the *Pax3*^{+/+} control mouse. Section thickness: C = 10 µm; D, E and G = 1 µm. Bars: B = 1 mm; C-E = 50 µm; G = 100 µm.

Supplementary Figure S2:

Immunostaining against PAX3 and GFP on optical transverse sections of the truncal back skin from *Pax3*^{GFP/+} embryos at E12.5 (A), E14.5 (B), and E16.5 (C); on transverse sections of a HF from a *Pax3*^{GFP/+} mouse at P8 (anagen VI of the 1st hair cycle) in the upper transitory part (D) and in the hair bulb (E). Immunostaining against PAX3 is shown in red, against GFP in green. The PAX3 signal is mainly nuclear whereas the GFP signal is both nuclear and cytoplasmic. DAPI counterstaining is present in every fluorescent panel. Dotted lines indicate the position of the epidermis basement membrane or HFs. Arrowheads point to GFP-expressing cells that do not express PAX3. Section thickness = 1 µm. Bars = 50 µm.

Supplementary Figure S3:

(A): Phenotype of (left) : a *Kit^{W-v/W-v}; Pax3^{GFP/+}* mouse next to a *Kit^{W-v/+}; Pax3^{GFP/+}* littermate on a C57BL/6J-129/Sv mixed background at 3 ½ months ; (right) : a *Kit^{W-v/W-lacZ}; Pax3^{GFP/+}* mouse next to a *Kit^{+/+}; Pax3^{GFP/+}* littermate on a C57BL/6J-129/Sv mixed background at P8. The *Kit^{W-v/W-lacZ}; Pax3^{GFP/+}* pup is growth retarded and has a white coat color due to the mutations in *Kit*. (B): Transverse sections of a vibrissa from a *Kit^{W-v/W-lacZ}; Pax3^{GFP/+}* embryo at E16.5. Within the vibrissa, no GFP⁺ cells can be found. The dermal cells responsible for the bright GFP signal are not pigment cells. (C-D): Transverse sections of the truncal back skin from a *Pax3^{GFP/+}; Kit^{W-v/W-lacZ}* embryo at E16.5 (C) and from a *Pax3^{GFP/+}; Kit^{W-v/W-lacZ}* mouse at P8 (anagen VI of the 1st hair cycle) (D). GFP⁺ cells were visualized directly under the microscope. Dotted lines indicate the position of the epidermis basement membrane. The epidermis and hair shafts in (D) show background signal due to auto-fluorescence in keratinocytes. Arrows and arrowheads point to GFP⁺ cells with a dendrite like structure and GFP⁺ cells located in the dermis respectively. Sections thickness: 10 µm. Bars: B = 50 µm; C = 100 µm; D = 150 µm.

Supplementary Figure S4:

Skin suspensions from neonatal mice were seeded in a melanocyte differentiation medium without feeder cells either directly (A-B) or after FACS sorting of GFP⁺ cells (C-E). (A): Aspect of 3-week-old cultures of unsorted dermal cells from skin suspensions from *Pax3^{GFP/+}* mice at P5. The cultures contain only pigmented, dendritic differentiated melanocytes that express GFP. (B-C): comparison of cultures of dermal cells from *Pax3^{+/+}* and *Pax3^{GFP/+}* mice at P2, 12 days after seeding. *Pax3^{+/+}* cells (B) were seeded directly whereas *Pax3^{GFP/+}* cells were sorted by FACS and GFP⁺ cells only (C) were seeded. Seeding density was the same in (B) and (C). The area photographed in (B) was chosen as melanocyte-rich whereas the corresponding dish contained also keratinocytes and fibroblasts. (D-E) : Immunostaining on dermal cells from the back skin of *Pax3^{GFP/+}* mice at P0, plated on coverslips after 10 days of culture. Immunostaining against GFP (green) and PAX3 (red) (D) or GFP (green) and DCT (red) (E). The cells, whether pigmented or not pigmented, are all GFP⁺ and co-express PAX3 and DCT. At lower magnification (A, left), no GFP picture could be taken as the GFP signal was not visible; at intermediate magnification (C), only the strong nuclear GFP signal is seen; at higher magnification (D-E), both the nuclear and weaker cytoplasmic signal are seen. Optical section thickness (D, E) = 1 µm. Bars : A = 100 µm; B-C = 50 µm ; D-E= 20 µm.

Supplementary Figure S5:

FACS dot plots of cells isolated from *Kit^{+/+}; Pax3^{+/+}* (A), *Kit^{+/+}; Pax3^{GFP/+}* (B-C) and *Kit^{W-v/W-v}; Pax3^{GFP/+}* (D-E) skin layers, either dermis (A, C, E) or epidermis (B, D). *Kit^{W-v/W-v}; Pax3^{GFP/+}* pups from 2 different litters (2 littermates at P6, 1 pup at P3) were mixed to get enough cells. GFP fluorescence was observed on the FITC channel (top panels). The corresponding graphs representing cell counts by the GFP fluorescence (FITC) channel are shown in the right panel (A) or in the bottom

panels (B-E). In the epidermis from *Pax3*^{GFP/+} mice (B), there is only one major population of GFP⁺ cells; these cells express high levels of GFP (GFP^{high}); the GFP^{high} population is missing in the epidermis from *Kit*^{W-v/W-v}; *Pax3*^{GFP/+} mice (D). In the dermis from *Pax3*^{GFP/+} mice (C), there are two major populations of GFP⁺ cells expressing either low (GFP^{low}) or high levels (GFP^{high}) of GFP; the GFP^{high} population is missing in the dermis from *Kit*^{W-v/W-v}; *Pax3*^{GFP/+} mice (E). The number of cells recovered for each population is indicated on the plots.

Supplementary Figure S6:

Transverse sections of the skin from *Pax3*^{GFP/+}; *Kit*^{W-v/W-lacZ} mice at P8 (1st hair cycle). (A-B): Upper parts of a zig-zag (A) and a guard (B) HF. GFP⁺ cells were visualized directly under a fluorescence microscope. (C-D): Double immunostaining of the lower permanent part (LPP) of a HF using an anti-GFP (green) and either an anti-PAX3 (C) or an anti-K5 (D) (red) antibody. (E-F): Immunofluorescence staining of the LPP of a HF using an anti-laminin (E) or an anti-nestin (F) antibody; GFP⁺ cells were visualized directly under a fluorescence microscope.

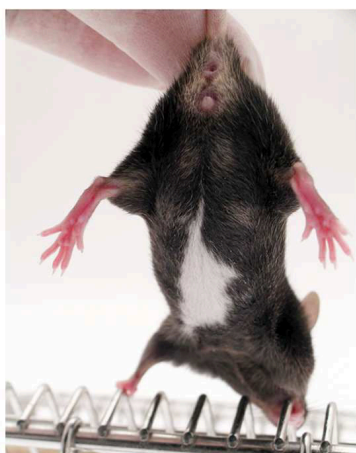
Arrows point to GFP⁺ cells with a dendrite-like structure in the bulge area of the HF. These cells express PAX3 (C) and nestin (F) but not K5 (D) and are located within the HF, within the laminin-positive basal membrane (F).

Dotted lines indicate the position of the epidermis basement membrane of HFs. Section thickness: A-H = 10 μ m and E-H = 1 μ m. Bars: A = 100 μ m; B-D = 150 μ m, E-F = 20 μ m and G-H = 50 μ m.

A

P90, *Pax3*^{GFP/+}

Brightfield

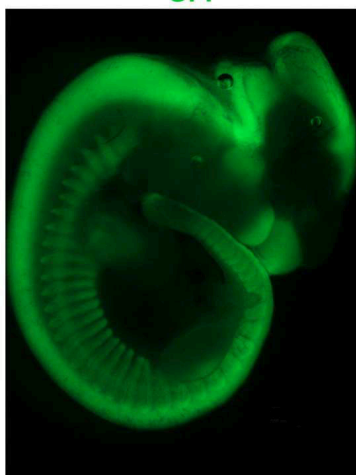


GFP

B

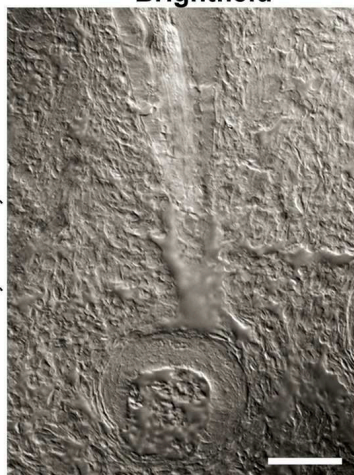
E11, *Pax3*^{GFP/+}

Brightfield

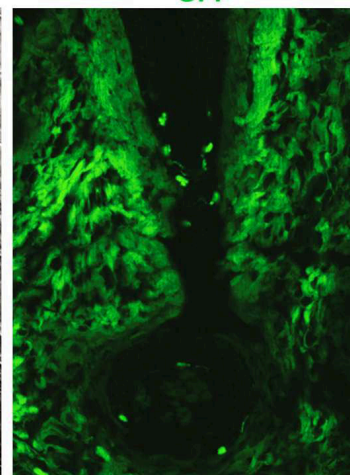


GFP

C

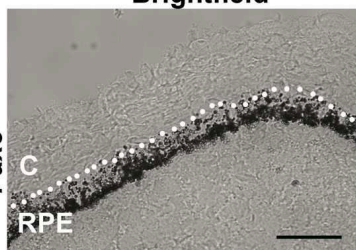
Vibrissa, E16.5, *Pax3*^{GFP/+}

Brightfield

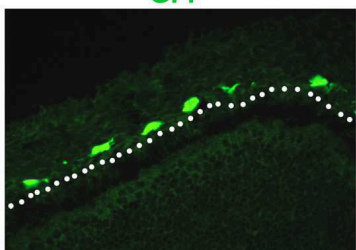


GFP

D

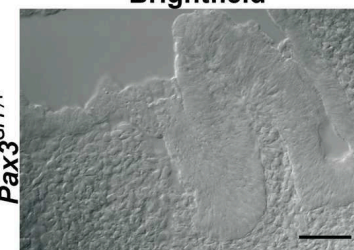
Eye, E14.5, *Pax3*^{GFP/+}

Brightfield

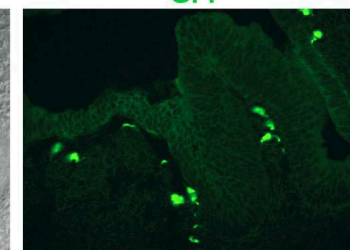


GFP

E

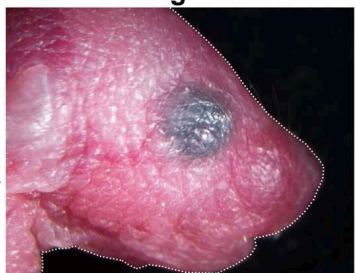
Inner ear, E14.5, *Pax3*^{GFP/+}

Brightfield

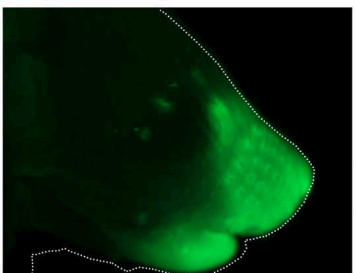


GFP

F

P1, *Pax3*^{GFP/+}

Brightfield



DAPI+GFP

G

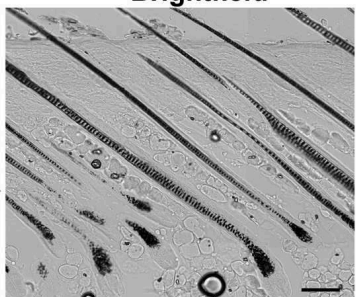
P1, *Pax3*^{+/-}

Brightfield

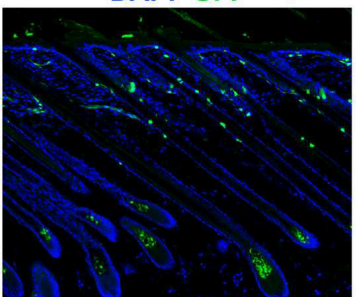


DAPI+GFP

G

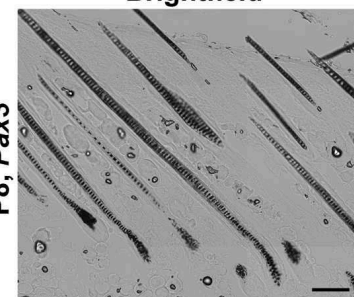
P8, *Pax3*^{GFP/+}

Brightfield

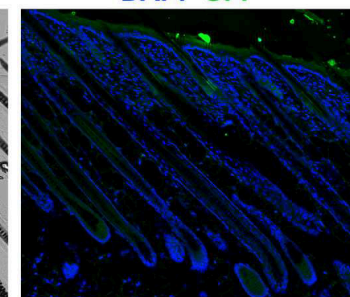


DAPI+GFP

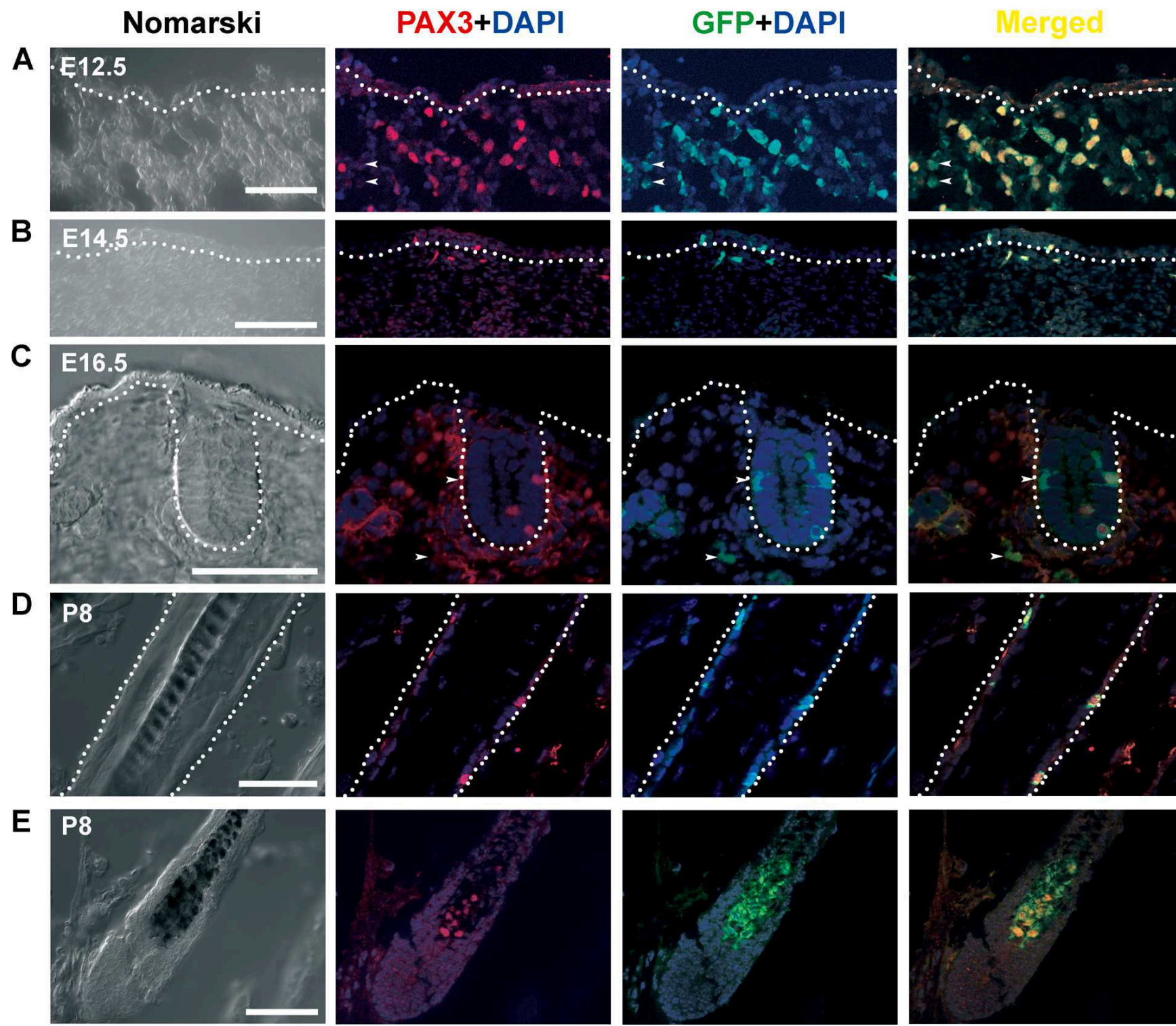
H

P8, *Pax3*^{+/-}

Brightfield



DAPI+GFP



P111, *Pax3*^{GFP/+}

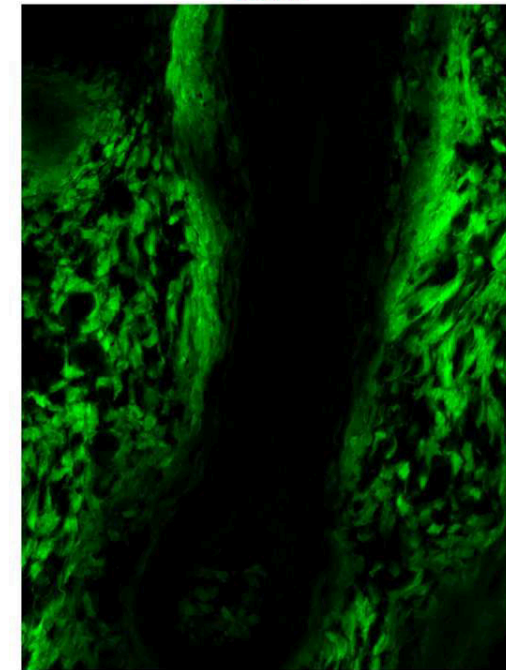
P8, *Pax3*^{GFP/+}

Vibrissa, E16.5, *Kit*^{W-v/W-lacZ} *Pax3*^{GFP/+}
Nomarski GFP

A



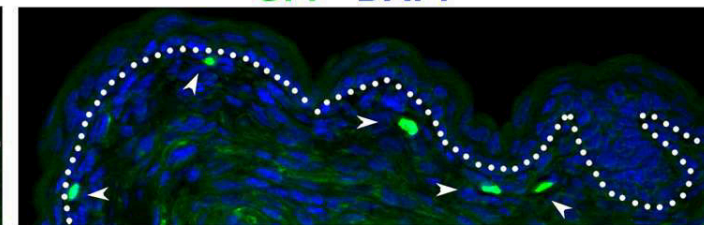
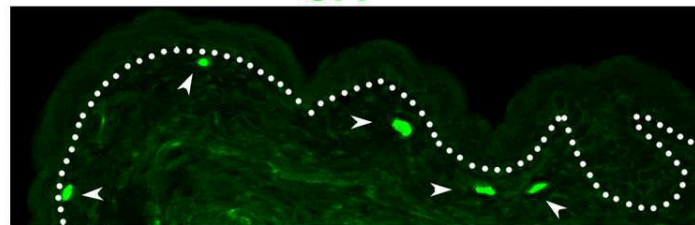
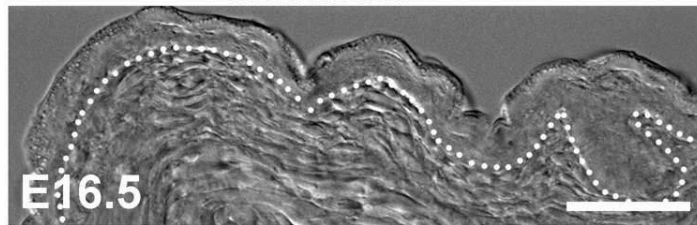
B



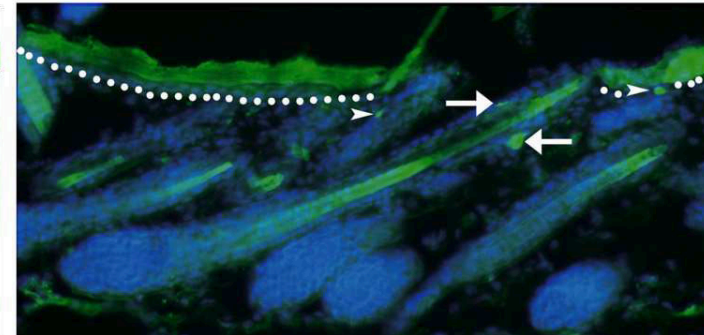
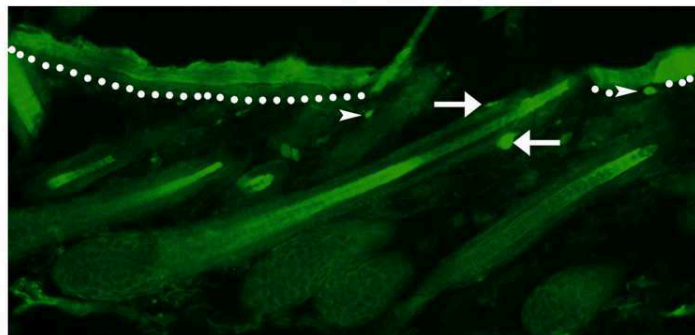
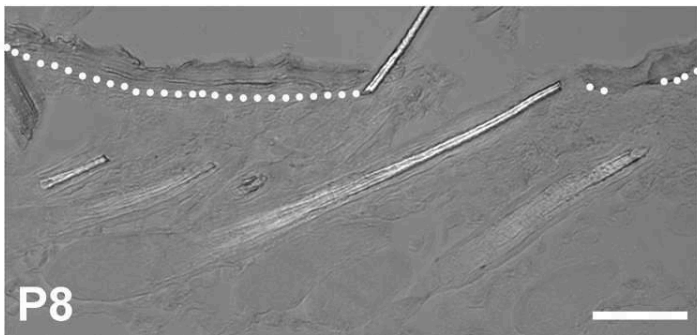
Skin, *Kit*^{W-v/W-lacZ} *Pax3*^{GFP/+}
GFP

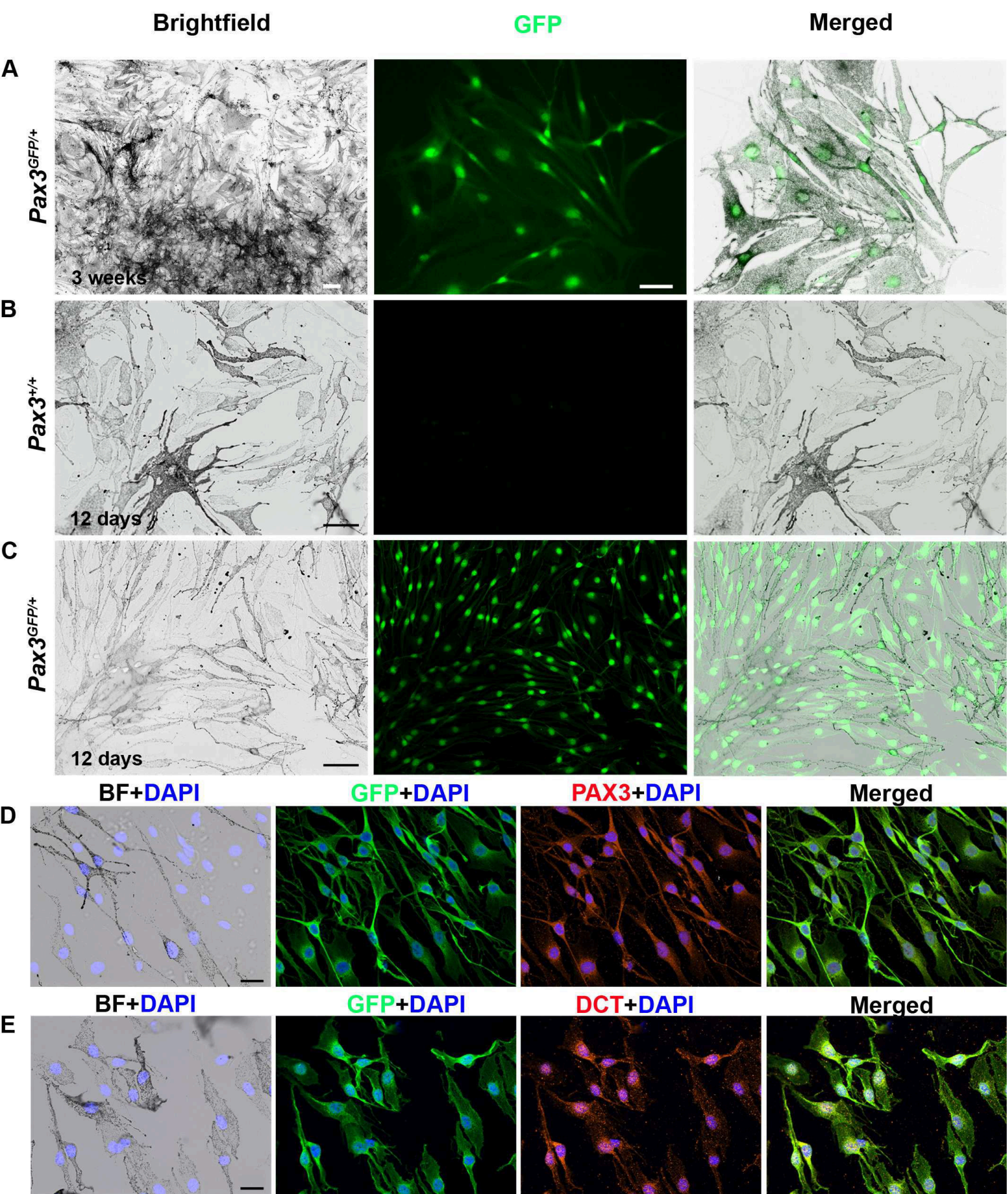
Nomarski

C



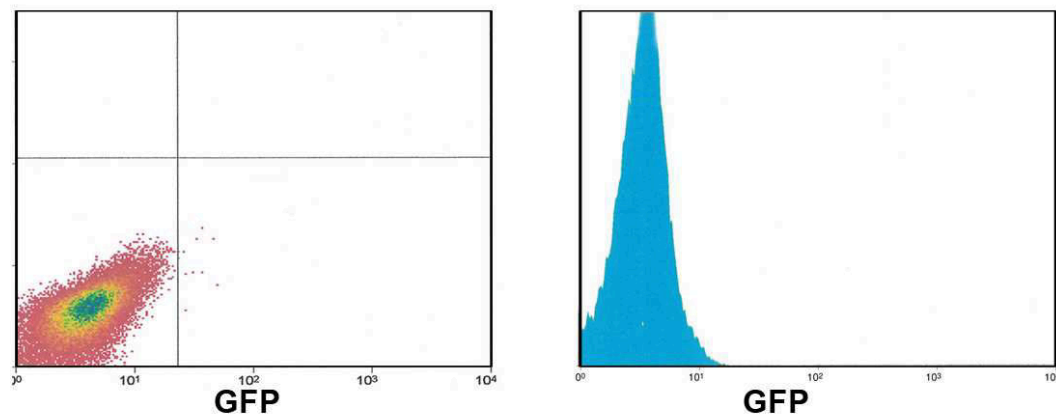
D





P6, *Kit*^{+/+} *Pax3*^{+/+}, Dermis

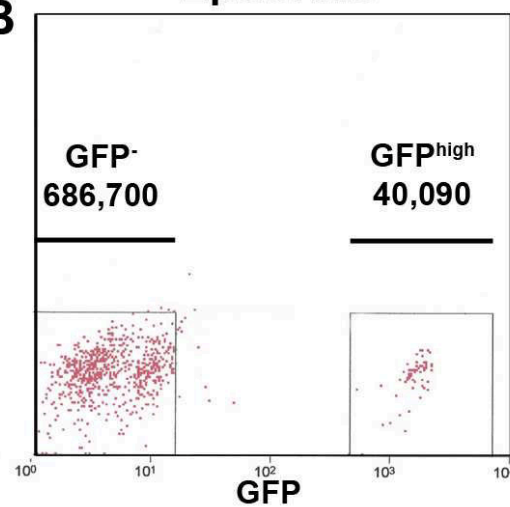
A



P6, *Kit*^{+/+} *Pax3*^{GFP/+}

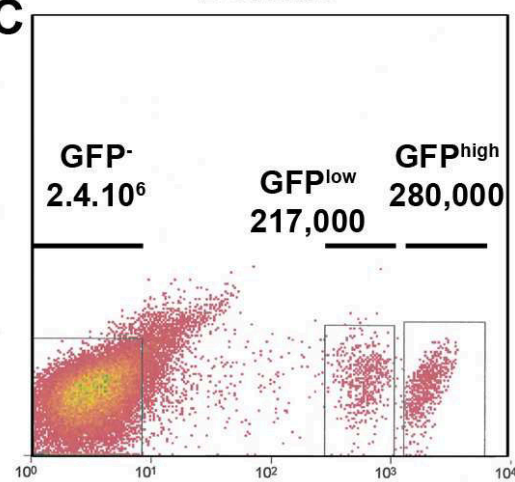
B

Epidermis



C

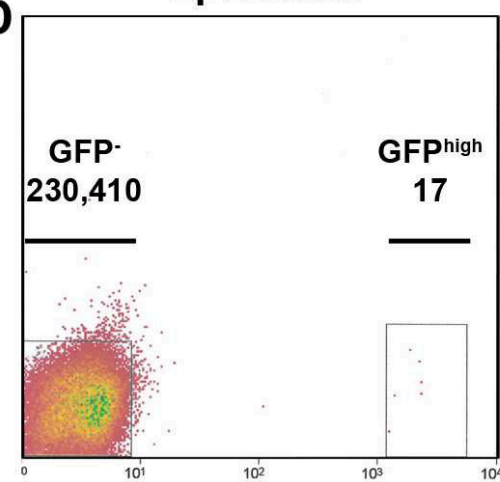
Dermis



P3-P6, *Kit*^{W-v/W-v} *Pax3*^{GFP/+}

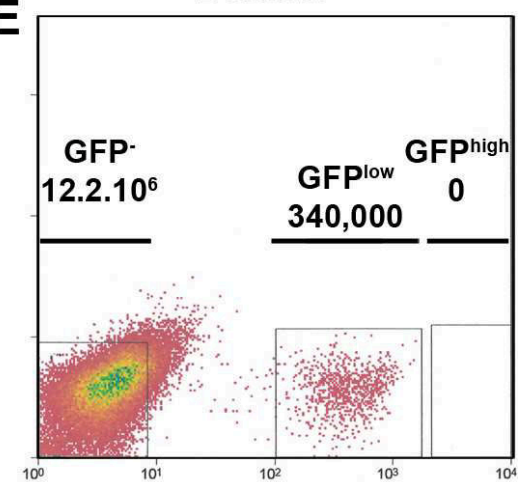
D

Epidermis

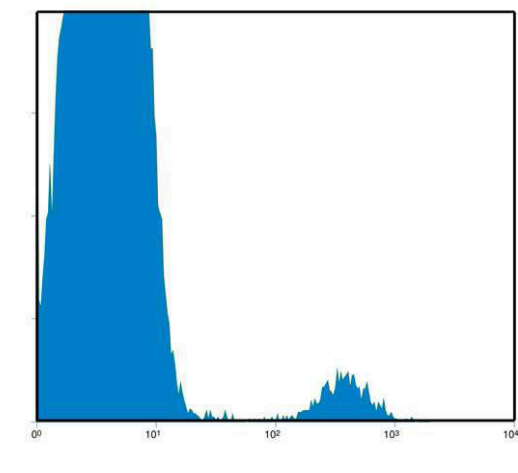
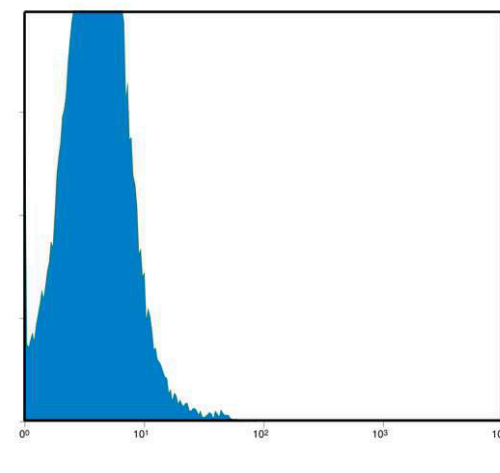
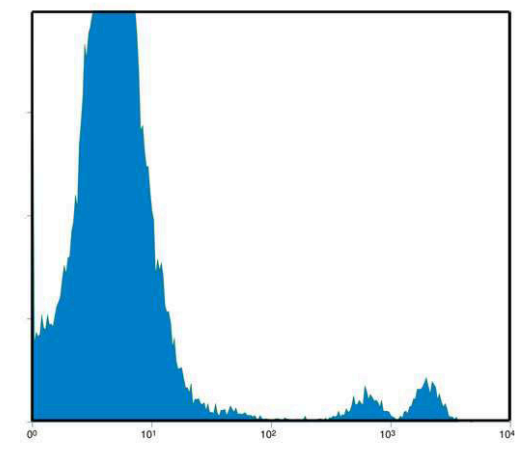
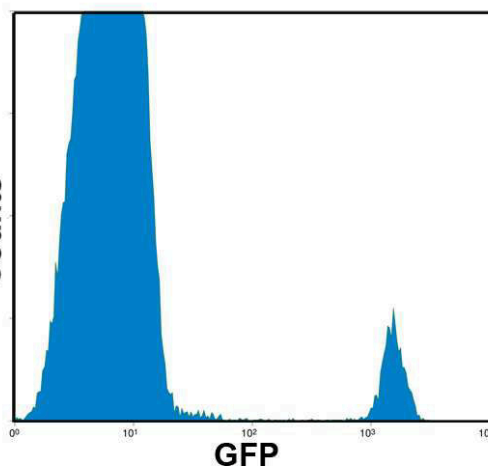


E

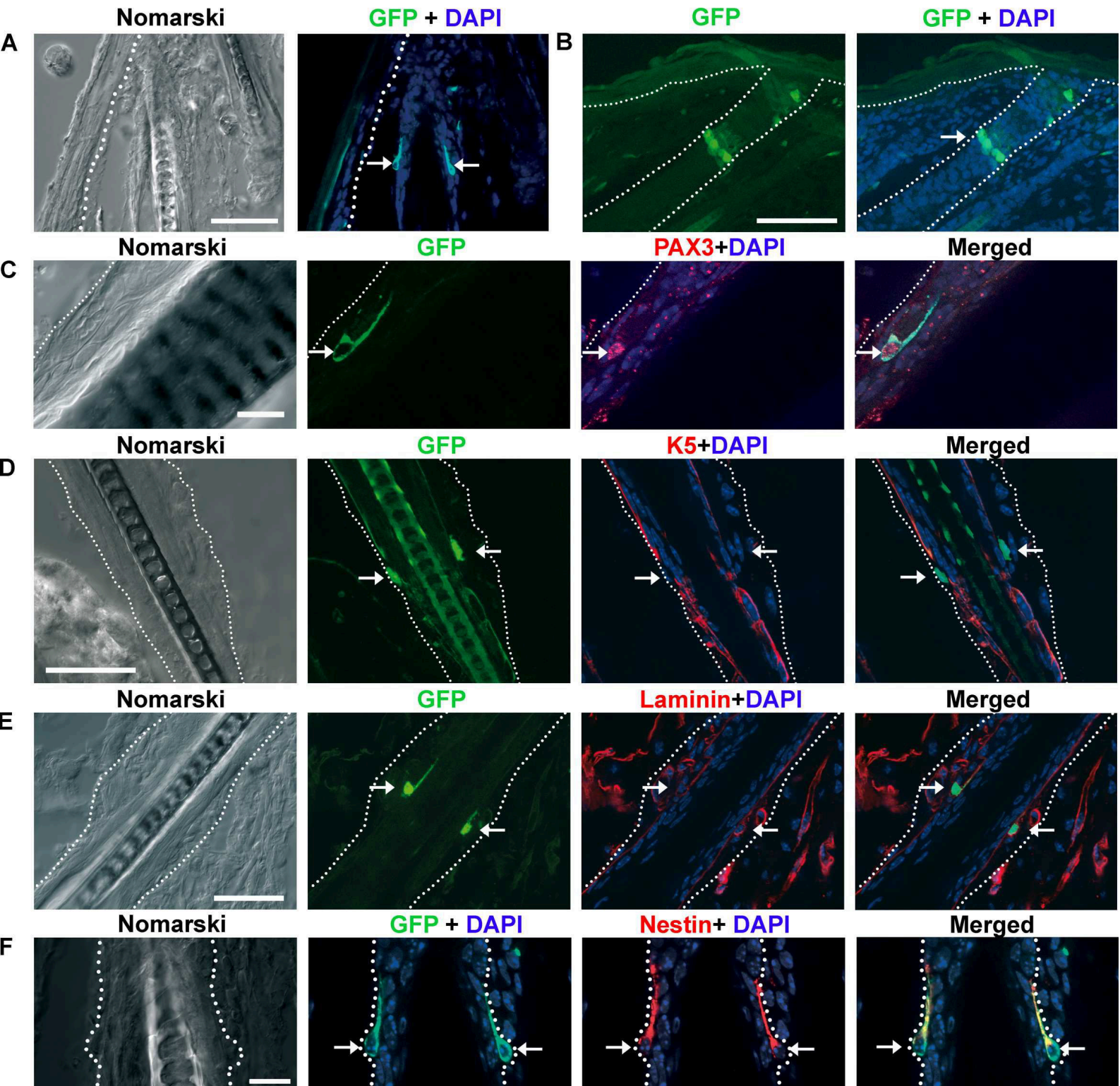
Dermis



Counts



Hair Follicle Bulges, P8, *Pax3*^{GFP/+} ; *Kit*^{W-v/W-lacZ}



II - CARACTERISATION PHENOTYPIQUE D'UN MODELE DE MELANOME : LA LIGNEE

Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}

A - Proposition de classification des lésions mélanocytaires de la lignée

Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}

La lignée *Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}* est largement distribuée dans la communauté scientifique étudiant le mélanome. Nous avons cependant constaté que malgré sa fréquente utilisation, ce modèle n'était qu'incomplètement caractérisé. La description initiale du modèle ne mentionne en effet que deux types de lésions cutanées : des plages d'hyperpigmentation et des mélanomes (Ackermann *et al.*, 2005). Les lésions extracutanées décrites sont limitées aux métastases ganglionnaires, hépatiques et pulmonaires. Il nous est également apparu que la terminologie utilisée était inconstante entre les auteurs. Les lésions bénignes sont par exemple qualifiées d'« hyperplasie des mélanocytes », « naevus » ou « hyperpigmentation ».

L'utilisation de cette lignée dans notre laboratoire nous a montré que les lésions développées chez ces animaux étaient en réalité plus complexes et variées, et méritaient une description anatomopathologique détaillée. Nous avons pour cela décidé d'établir et de publier un atlas des lésions macroscopiques et surtout microscopiques de ce modèle. Le but de ce travail était double : d'une part établir un outil de référence pour l'ensemble des chercheurs utilisant ce modèle et qui constituerait la base d'une terminologie commune ; d'autre part, comparer les lésions mélanocytaires observées avec les lésions connues chez l'homme afin de mieux apprécier la pertinence du modèle. Pour ce dernier point nous avons collaboré avec un médecin anatomopathologiste afin de nous assurer de la pertinence de nos observations et de nos critères de diagnose.

Nous avons montré que les souris *Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}* développent séquentiellement quatre types de lésions mélanocytaires allant de lésions bénignes à d'authentiques mélanomes métastatiques. Ces lésions se rapprochent morphologiquement de la famille des naevi bleus chez l'homme. Nous avons également décrit des lésions mélanocytaires primitives dans d'autres localisations que la peau (yeux, encéphale, glande de Harder). Nous avons enfin souligné les difficultés que peut poser ce modèle pour l'interprétation de certaines lésions, notamment les lésions cutanées que nous avons nommées lésions de type C ou naevi atypiques. Nous n'avons pu en effet déterminer avec certitude s'il s'agissait là de lésions pré-cancéreuses ou malignes.

Les résultats de ce travail ont été publiés dans l'article suivant dont je suis co-auteur. J'ai réalisé ce travail en collaboration avec Cécile Campagne dont le sujet de thèse portait sur le rôle de la protéine RACK1 (*Receptor for Activated C-Kinase 1*) dans le développement du mélanome cutané *in vivo*, et qui a été amenée à utiliser cette lignée pour ses travaux (Campagne, 2012). Dans cette collaboration, j'ai effectué l'analyse de tous les prélèvements histopathologiques et proposé une classification des lésions mélanocytaires dont j'ai déterminé les critères de diagnose et établi un atlas.

ARTICLE 2

***Histopathological atlas and proposed classification for melanocytic lesions in
Tyr::NRAS^{Q61K} ; Cdkn2a^{-/-} transgenic mice***

(Publié dans Pigment Cell and Melanoma Research)

Histopathological atlas and proposed classification for melanocytic lesions in *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* transgenic mice

Contact: Cécile Campagne^{1,2,§,†}, Edouard Reyes-Gomez^{1,2,3,†}, Maxime Battistella^{4,5,6}, Florence Bernex^{1,2,3,‡}, Sophie Château-Joubert³, Hélène Huet³, Friedrich Beermann⁷, Geneviève Aubin-Houzelstein^{1,2,8} and Giorgia Egidy^{1,2,8}

¹UMR955 de Génétique fonctionnelle et médicale, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, INRA, Maisons-Alfort, France

²Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France

³Unité d'Embryologie, d'Histologie et d'Anatomie pathologique, Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

⁴Laboratoire de pathologie, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁵U728, INSERM, Paris, France

⁶Laboratoire de pathologie, AP-HP-Hôpital Saint-Louis, Paris, France

⁷ISREC, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland

⁸Département de Biologie du Développement, Unité de Génétique Fonctionnelle de la Souris; CNRS URA 2578, USC INRA, Institut Pasteur, Paris, France

[‡]Current address: RHEM-Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U896, Montpellier, France

[§]Current address: Department of Radiation Oncology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

[†]Both authors contributed equally to this work.

e-mail: gegidy@vet-alfort.fr

Doi: 10.1111/pcmr.12115

In humans, cutaneous melanoma (CM) is the deadliest cutaneous cancer. In recent years, the identification of recurrent mutations in CM allowed partial understanding of the molecular pathogenesis of CM. Mutations in the proto-oncogene *NRAS* occur in 18% to 20% of CM and are particularly frequent in the nodular subtype (Lee et al., 2011). *NRAS* mutations mostly occur in codon 61 of exon 2 where a lysine replaces a glutamine (Q61K), leading to a constitutively activated *NRAS* protein that promotes both proliferation and survival of melanoma cells (Ellerhorst et al., 2011; Lee et al., 2011). Interestingly, *NRAS* mutations are associated with distinct clinical and pathological features such as worse prognosis and shorter melanoma-specific survival (Devitt et al., 2011).

Inactivation of the *CDKN2A* locus, which encodes the two tumor suppressor proteins p16^{INK4A} and p14^{ARF}, is also frequently encountered in CM (Serrano et al., 1996) and most often occurs through deletion (Funk et al., 1998). Both mono- and bi-allelic deletions are found and are associated with shorter median survival (Grafstrom et al., 2005).

The need for a reliable model of human CM led to the generation of transgenic mice combining both dominant-active *NRAS* targeted to the melanocyte lineage (*Tyr::NRas^{Q61K}*) and

partial or total deletion of the *Cdkn2a* locus. These *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* and *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/+}* mice spontaneously develop metastasizing CM (Ackermann et al., 2005). Over the years, this model gained wide popularity in preclinical studies investigating the links between causative mutations, tumor progression and response to new therapeutics. However, to date, histopathological description of this model remains scarce and the terminology quite inconsistent among authors. Accurate pathological description and classification of melanocytic lesions (ML) is essential to evaluate animal models of melanoma (Sellers and Ward, 2012; Walker et al., 2011). Here, we propose a detailed histopathological atlas and classification of melanocytic lesions encountered in *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* or *Cdkn2a^{-/+}* transgenic mice along with their main microscopic features, with a particular emphasis on cutaneous ML. Our data highlight the histopathological specificity of melanoma in comparison to the other ML encountered in this model. Comparison to human ML is briefly discussed.

Melanocytic lesions in *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* or *Cdkn2a^{-/+}* mice were commonly observed in the skin, lymph nodes, brain, eyes, and lungs. Infrequent sites included liver,

spleen, heart, hardierian gland and epididymis. The most common lesions and their frequency in the 35 necropsied mice are summarized in Table S1. Types of lesions and incidence did not vary between sexes. Gross features are summarized in Figure S1.

Primary cutaneous ML were invariably present in the skin and were observed on gross examination as early as 2 months of age (Figures 1 and 2; Table 1). At that time, cutaneous thickness progressively increased and tousled, disarranged hairs arose giving a dull appearance to the mouse fur (Figure S1a-c). The distribution of ML ranged from patchy, with well-individualized lesions, to continuous when ML were numerous and coalesced. The type, number, size, distribution and density of ML could vary among different samples from the same animal. Overall, microscopic small cutaneous ML occurred all over the body, while no gross lesion was found on ventral skin.

Microscopically, ML encompassed a morphological spectrum in which we identified four main types of ML. In such a spectrum, a type was defined only when significantly distinctive morphological features were observed and could be relevant for the model. Occasionally, some lesions could not be assigned to a single type due to intermediate features.

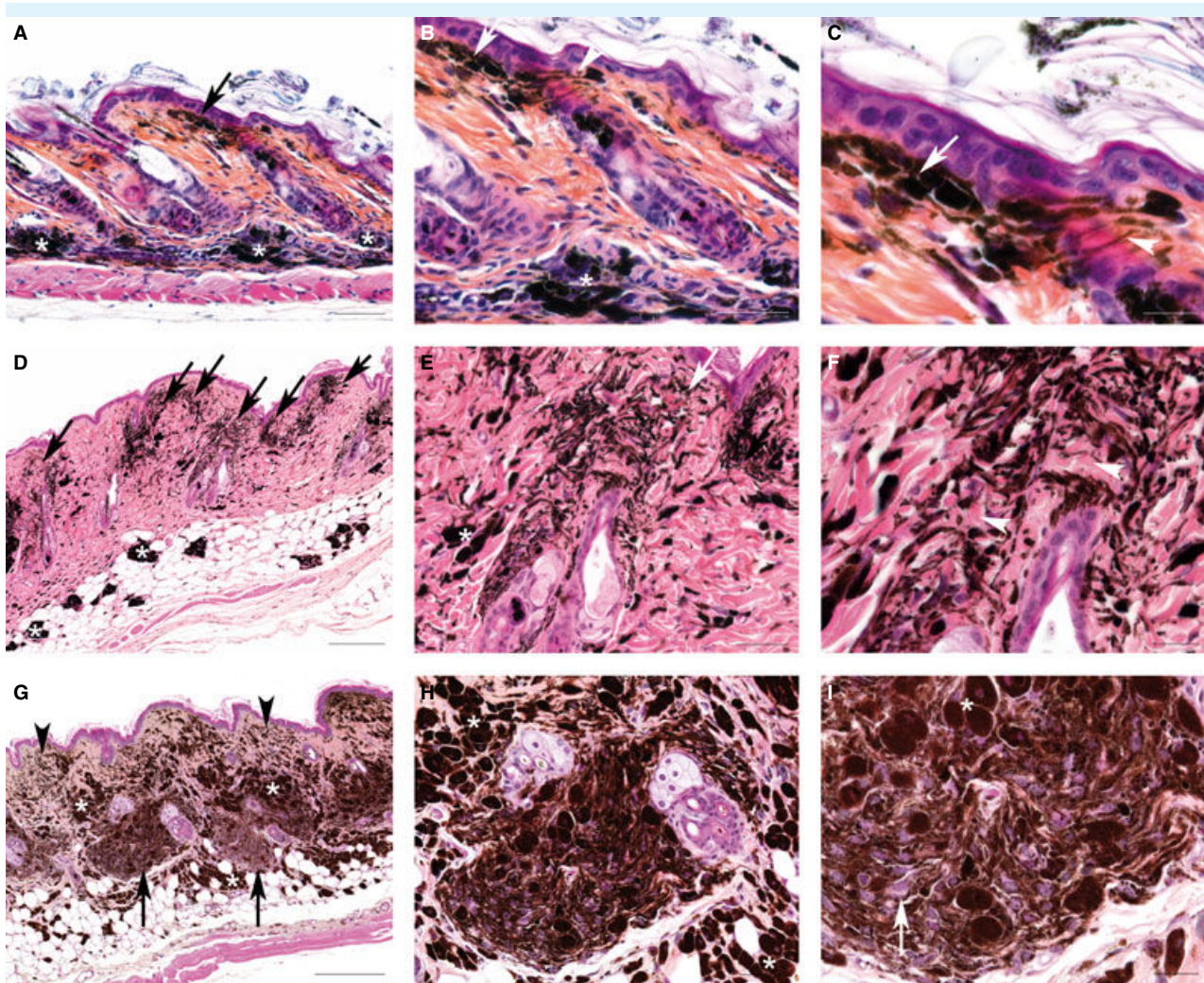


Figure 1. Early cutaneous melanocytic lesions in *Tyr::NRas^{O61K}; Cdkn2a^{-/-}* mice. A-C: Skin from postnatal day 21: small groups of melanocytes (early ML-A) were already present under the epidermis (A: black arrow; B, C: white arrows) or in the vicinity of the upper part of hair follicles (B, C: white arrowhead). Small clusters of melanophages were found in the deep dermis (A, B: asterisks). D-F: Skin from young adult (about 1.5 months) with ML-A (classical blue nevus): ML-A were small ill-defined and stellate-shaped lesions that frequently developed around hair follicles (D: black arrow; e: white arrow). They displayed heavily pigmented, spindle shaped melanocytes with small nuclei (F). Note that melanocytes were not tightly packed but rather separated by collagen fibers (F: white arrowheads). Small clusters of melanophages were found in the hypodermis (D: asterisks) or in the dermis, in the vicinity of ML-A (E: asterisks). G-I: Skin from adult with ML-B (cellular blue nevus). Compared to ML-A (G: black arrowheads), ML-B (G: black arrows) were larger, round to piriform, had better defined contours and displayed larger melanocytes that were more tightly packed (H, I). Note that nuclei were larger and more discernible than in ML-A (I: white arrow). Small clusters of melanophages were found in the dermis and the hypodermis (G, H, I: asterisks). HES stain. Bars: A, B, E, H = 50 μm ; C, F, I = 20 μm ; D, G = 200 μm .

In terms of clinical behavior, these four types of ML also formed a spectrum ranging from benign lesions (nevus type A and B) to malignant lesions (melanoma) with an intermediate category of melanocytic lesions of unknown malignant potential (atypical nevus).

Melanin-containing macrophages, called melanophages afterwards, were present in the dermis and the hypodermis and were associated with

all types of ML. They were distinguished from melanocytes by their larger size and round to polygonal shape. When melanophagic infiltration was severe, ML were difficult to individualize. The intensity of melanophagic infiltration could vary among different samples from the same animal.

ML-A (classical blue nevus) (Figure 1A-F) were the predominant type of ML. Because of their small size

(usually less than 200 μm) they were not grossly discernible. They were observed in mice from 21 days of age (Figure 1A-C). The smallest ML-A were composed of only few melanocytes. ML-A occurred in the dermis, usually in the vicinity of hair follicles. They were frequently stellate shaped due to ill-defined contours that blended in the surrounding dermis. Their cellularity was moderate as melanocytes were separated by collagen

Table 1. Main features for the diagnosis of cutaneous ML in *Tyr::NRas^{061K}; Cdkn2a^{-/-}* transgenic mice (short-summary)

	Nevus		Atypical nevus	Melanoma
	Type A lesion	Type B lesion	Type C lesion	Type D lesion
Size	Usually < 200 μ m (not grossly visible) May be composed of only few melanocytes	Usually > 200 μ m but not grossly visible	Usually > 200 μ m (usually grossly visible) May coalesce horizontally and form plaques	Usually > 2 mm (grossly visible)
Location	Dermis, usually in the vicinity of hair follicles	Dermis, usually in the vicinity of hair follicles	Usually upper and mid dermis Large lesions may occupy entire dermis	Usually dermis and hypodermis
Contour/Shape	Ill-defined contours that blend in the dermis Stellate shape	Usually well-defined contours Roughly nodular or piriform shape	Usually ill-defined contours Rarely, cells invade the epidermis Forms nodule or plaques	Usually well-defined contours Nodular shape
Cellular density	Low: cells separated by collagen bundles	High: cells are tightly packed with few to no collagen bundles	High: cells are tightly packed with few to no collagen bundles	High with delicate stroma
Cell shape	Spindle High NCR	Spindle Moderate NCR	Spindle to epithelioid Moderate to low NCR	Spindle to epithelioid Moderate to low NCR
Nucleus	Small with fine/dusty chromatin Small/absent nucleolus	Round with fine chromatin Small nucleolus	Round with clear chromatin Round and large nucleolus	Round with clear chromatin Round and large nucleolus
Atypias	Absent	Absent or subtle	Moderate	Moderate to high
Mitosis	Absent	Absent	≤ 1 per 10 HPF	≥ 5 per 10 HPF
Pigment	Abundant	Abundant to moderate	Usually scarce in upper-dermis cells, moderate to abundant in lower dermis cells	Usually low to absent but some lesions well-pigmented
Vessels	Absent	Small vessels may be present	Small vessels usually well discernable	Abundant with pseudorosettes formation
Necrosis/ulceration	Absent	Absent	Ulceration is rare Necrosis is absent	May be present

Lesions were classified as ML-A, -B, -C and -D. This order is believed to reflect the progression from benign to malignant melanocytic lesions. Certain lesions may be difficult to assign to a single category due to intermediary features.

NCR, Nucleo-cytoplasmic ratio; HPF, high power field.

fibers. Melanocytes were small, spindle-shaped, heavily pigmented and had little cytoplasm (high nucleo-cytoplasmic ratio (NCR)). Their nucleus was small and poorly discernible due to abundant pigmentation. When visible, it harbored a fine and dusty chromatin and usually no nucleolus. Mitoses were absent. These morphological features supported a benign behavior (nevi).

ML-B (cellular blue nevus) (Figure 1G-I) were usually larger than ML-A but remained grossly indistinguishable. They were detected from 3 months onwards. They were well-demarcated, nodular to piriform and highly cellular lesions with densely packed melanocytes. Melanocytes were spindle-shaped and well pigmented but had more cytoplasm (moderate NCR) than in ML-A. Some epithelioid cells might be present. The nucleus, usually discernible, was

round with a fine chromatin and a small nucleolus. Small capillaries could be present. These morphological features supported a benign behavior (nevi).

ML-C (atypical blue nevus) (Figure 2A-C) were usually grossly discernible and greater than 200 μ m but very small ML-C also occurred. Grossly, they appeared as small black nodules or plaques. They mainly occurred in the upper dermis but large lesions extended in the deeper dermis. They were apparent in 5.5-month-old mice. They usually had ill-defined contours and frequently coalesced horizontally to form large plaques that lifted the epidermis. The overlying epidermis could be hyperplastic and form deep rete ridge. Epidermal invasion was rare. ML-C had high cellularity with densely packed melanocytes. Melanocytes were plump, spindle-shaped to epithelioid

and had an abundant acidophilic cytoplasm (moderate to low NCR) that tended to be poorly pigmented in upper-dermis cells. The nucleus was round, large and frequently had a large acidophilic nucleolus. Atypias were moderate, and mitoses were rarely present (usually less than 1 mitosis per 10 high power fields (HPF) or per lesion). Small vessels were usually well discernible. Ulceration was rare. The malignant potential of ML-C was equivocal and difficult to determine based solely on morphological features.

ML-D (melanoma) (Figure 2D-I) were the less frequent but also the largest lesions. They first appeared in 7.5-month-old mice. They appeared as black, alopecic and frequently ulcerated nodules. They mostly arose from furry part of the skin and rarely on genitalia. They usually formed well-demarcated hypodermal nodules that

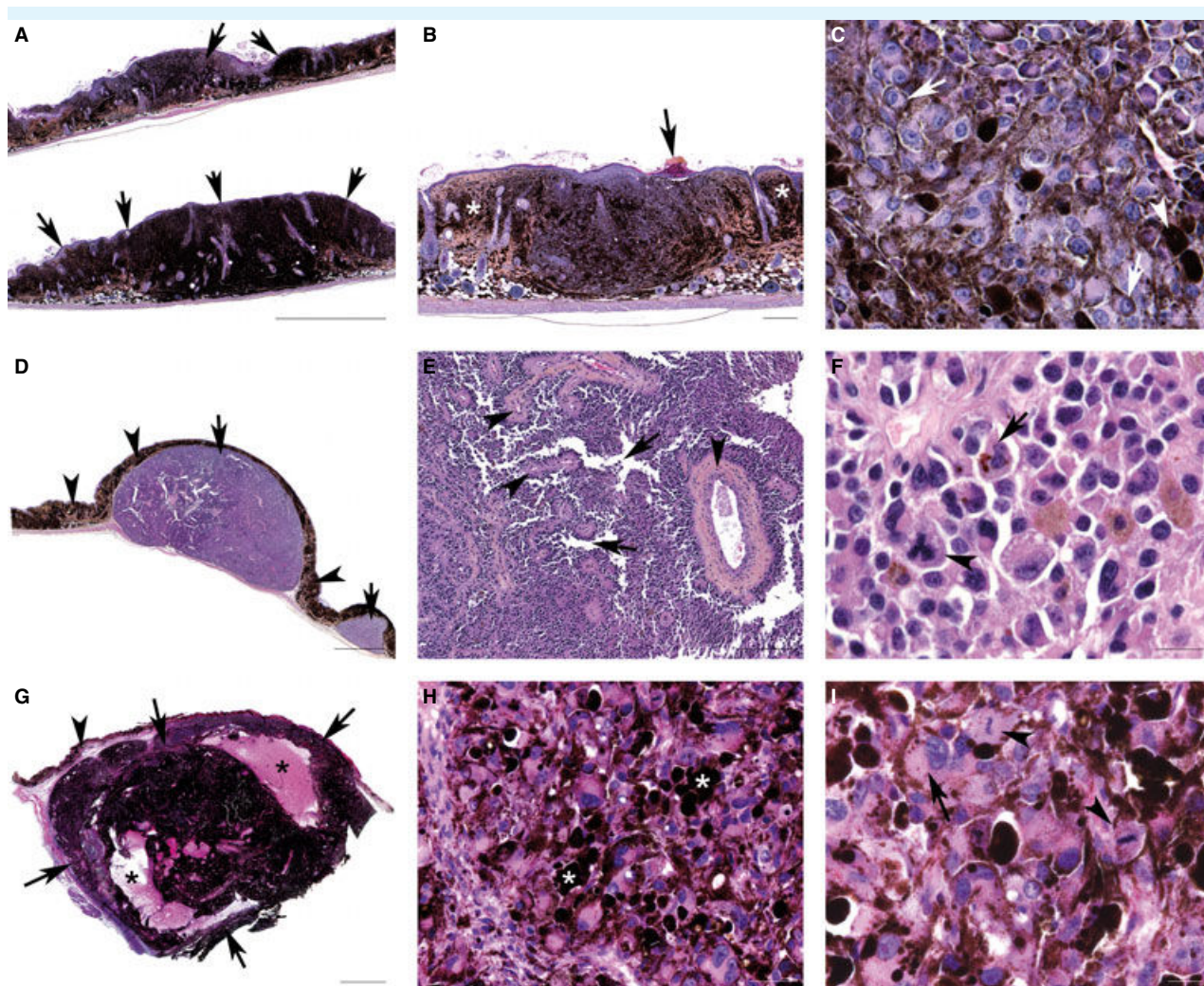


Figure 2. Late cutaneous melanocytic lesions in *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* mice. A-C: Skin from adult with ML-C (atypical blue nevus): ML-C often formed large plaques (A: black arrows) that lifted the epidermis. Some lesions were ulcerated or covered with crusts (B: black arrow). Lesions were large, ill-defined and could occupy the entire thickness of the dermis (A: bottom lesion, B). They were often surrounded by ML-A and/or ML-B and clusters of melanophages (B: white asterisks). They displayed epithelioid melanocytes with abundant cytoplasm and a round nucleus with a prominent nucleolus (C). Note that melanocytes (c: white arrows) were less pigmented than melanophages (C: white arrowhead). D-I: Skin from adult with ML-D (melanoma): ML-D were typically nodular, well-demarcated lesions in the hypodermis (D, G: black arrows). Lesions were usually poorly pigmented (D, E, F) compared to ML-A and ML-B in the overlying dermis (D, G: black arrowheads). Heavily pigmented ML-D were occasionally observed (G, H, I) and contained numerous clusters of melanophages (H: white asterisks). ML-D often had a loose architecture and a tendency to form artefactual clefts (E: black arrows). Necrosis and cavitation were observed in large tumors (G: black asterisks). In ML-D, melanocytes were arranged in bundles and often formed pseudorosettes around vessels (E: black arrowheads). Melanocytes were pleomorphic and variably pigmented (F, I: black arrows). Mitoses were usually numerous (F, I: black arrow heads) and some of them were atypical (F: tripolar mitosis). In (I), note that two mitoses were observed in the same high-power field. HES stain. Bars: A, D, G = 2 mm; B, E = 200 μ m; C, F, I = 20 μ m, H = 50 μ m.

occasionally encroached on the overlying dermis. These lesions were highly cellular with densely packed melanocytes that arranged in bundles or nests and frequently formed perivascular pseudorosettes. Artefactual clefts were frequently observed. Melanocytes were spindle to epithelioid with a moderate to abundant acidophilic cytoplasm (low to moderate NCR). Pig-

mentation was variable with the majority of lesions being poorly pigmented. Immunofluorescence for Melan-A and PEP-1 differentiation antigens performed on non-pigmented lesions or areas showed positive labeling confirming their melanocytic nature (Figure S2). The nucleus was round with a clear chromatin and an acidophilic nucleolus. Atypias were

moderate to high and mitoses were commonly observed. Although their frequency was variable between lesions, ML-D usually displayed more than 5 mitoses per 10 HPF. More specifically, the presence of more than 1 mitosis in a HPF was virtually restricted to ML-D (Figure 2I). Necrosis and ulceration were frequent. Vascular invasion or emboli were almost

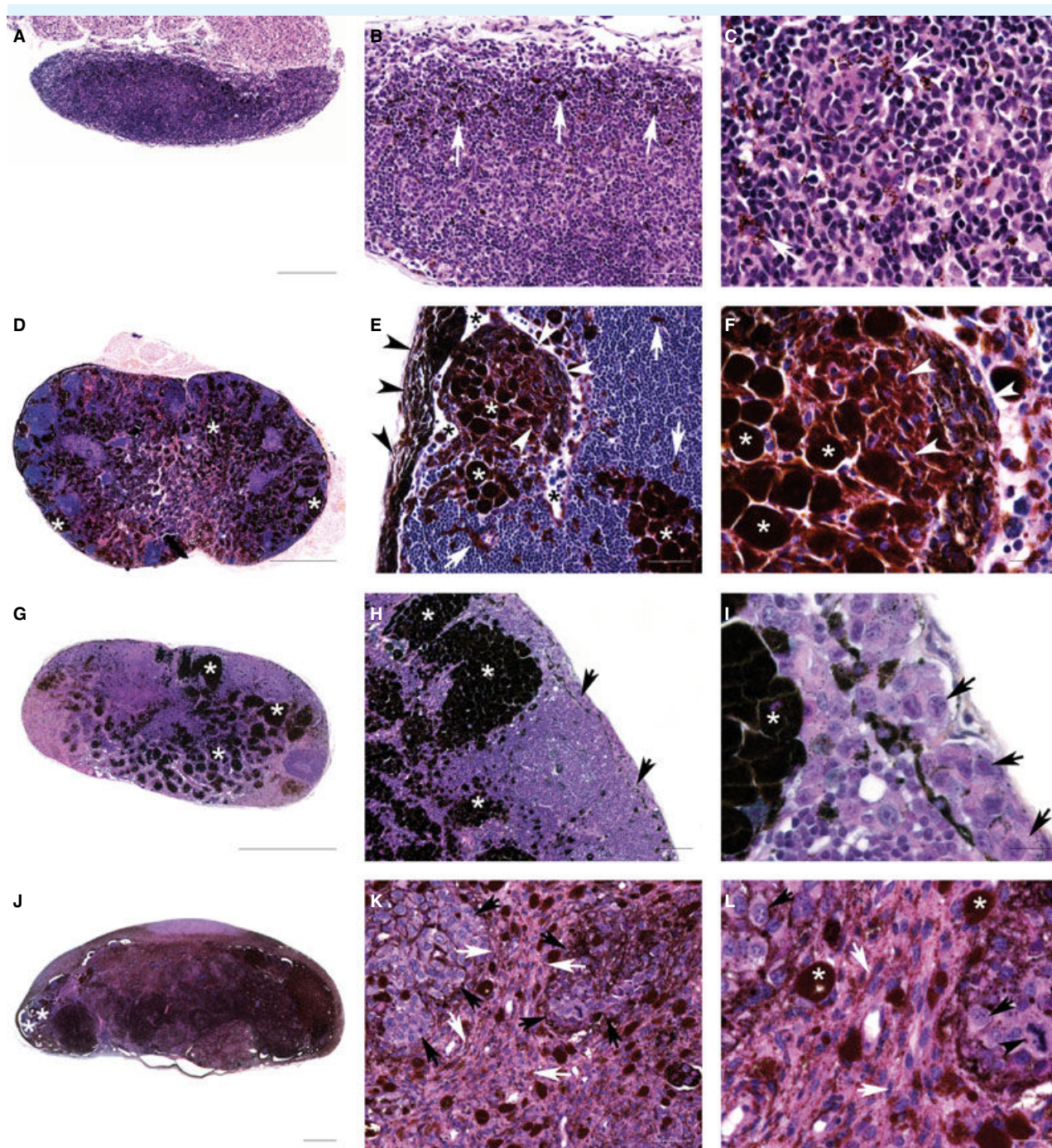


Figure 3. Nodal melanocytic lesions in *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* mice. A-C: Lymph node from postnatal day 21: Lymph nodes were small and contained some pigmented stellate cells interpreted as interdigitating dendritic cells (B, C: white arrows). D-F: Lymph node from young adult with nevi-like lesions and without concurrent cutaneous melanoma (ML-D): In this example, there were a capsular lesion (E: black arrowheads) and an intranodal lesion (E: white arrowheads). Both had histopathological features of ML-B and contained pigmented spindle melanocytes with bland nuclei (F: white arrows). Note that the subcapsular sinus (E: black asterisks) contained melanophages and inflammatory cells but no neoplastic cells. Note the prominent melanophagic infiltration (D, E, F: white asterisks) responsible for the enlargement of lymph node (dermatopathic lymphadenopathy). Pigmented interdigitating dendritic cells were also observed (E: white arrows). G-I: Early metastatic lymph node from an adult mouse: Malignant pleomorphic melanocytes with prominent nuclei were present in the subcapsular sinus (H, I: black arrows). Note the prominent melanophagic infiltration that is typical of adult lymph nodes (white asterisks). J-L: Metastatic lymph node from an adult mouse: In this example, the lymph node was severely enlarged due to the development of metastases and only contained scant residual lymphoid tissue (J: white asterisks). In the metastases, melanocytes were either spindle (K, L: white arrows) or epithelioid (K, L: black arrows). Note the mitosis (L: black arrowhead) and the melanophagic infiltration (L: white asterisks). HES stain. Bars: A = 200 μ m; B, E, K = 50 μ m; C, F, I, L = 20 μ m; D, G, J = 1 mm; H = 100 μ m.

never observed. These morphologic features were typical of a malignant melanocytic tumor (melanoma).

Table 1 summarizes histological features to be used for the diagnosis of cutaneous ML in *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}*.

Because lymph nodes are the first metastatic site for cutaneous melanoma, they were systematically sampled (Figure 3 and Figure S1d-f). In young animals, some pigmented cells were observed and interpreted as interdigitating dendritic cells (Figure 3A-C). With age, lymph nodes progressively enlarged and became infiltrated by melanophages, resembling dermatopathic lymphadenopathy in humans (Figure 3D-F) (Ioachim, 2009). In mice diagnosed with cutaneous melanoma (ML-D), metastases could be observed in satellite lymph nodes (Figure 3G-L). Melanoma cells could be found in the lymph node subcapsular sinus, particularly in early metastases (Figure 3G, I). ML resembling cutaneous ML, ranging from ML-A to ML-D, were observed in lymph node (Figure 3E,F). Surprisingly, nearly 35% of these nodal ML occurred in the absence of concurrent cutaneous melanoma (ML-D). In these cases, melanocytic cells were hardly detected in the subcapsular sinus.

In young animals, melanocytes were observed in the leptomeninges, particularly in the rostral region of the brain, a well-known site for meningeal melanosis in mice (Figures S1 g-i and S3). From 7.5 months onwards, some animals developed cerebral ML. Grossly, they appeared as a unique ill-demarcated pigmented lesion in the rostral region that eventually distorted the brain due to a mass effect. On histopathological examination, these lesions were diagnosed as melanoma and closely resembled cutaneous melanoma (ML-D). Some pigmented areas and nodules were occasionally observed on the corresponding region on the calvarium and revealed to be extensions from cerebral melanoma. Animals with cerebral melanoma did not systematically have concurrent cutaneous melanoma. The lesions were considered to be primary cerebral melanoma.

In young animals, melanocytes were observed in the choroid layers of the eye where they formed a thin and regular layer (Figure S4). From 3 months onwards, some animals

developed ocular ML resembling cutaneous ML with lesions ranging from ML-A to ML-D. ML-D were diagnosed as ocular melanomas and occurred from 7.5 months onwards. Animals with ocular melanoma did not systematically have concurrent cutaneous melanoma. The lesions were considered to be primary ocular melanocytic lesions.

After lymph nodes, lungs are considered to be the most common metastatic site for melanoma (Figures S1j-l and S5). On gross examination, melanoma metastases typically presented as multiple black spots (Figure S1j-l). On histopathological examination, metastases were frequently observed in the lungs and were typically associated with vessels. In one case, despite the absence of cutaneous gross features suggestive of malignancy, lung metastases were detected and histopathological analysis of the skin confirmed the presence of cutaneous ML-C/ML-D lesions.

The liver and the heart were infrequent sites for metastases with only 3 and 1 cases respectively.

Melanocytic lesions were observed in the spleen (2 cases), the hardyrian gland (1 case), and the epididymis (1 case) (Figure S6). Splenic and hardyrian lesions exhibited malignant features favoring a diagnosis of melanoma whereas the epididymal lesion had a benign aspect and resembled cutaneous ML-B. Although a metastatic nature could not be ruled out as concurrent cutaneous melanomas were observed in these mice, these lesions were considered to be primary rather than metastatic.

In *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* mice, a large spectrum of ML ranging from benign to malignant was observed in the skin. Four main types of lesions were identified and named as ML-A, ML-B, ML-C and ML-D, in a putative increasing order of malignancy. Indeed, ML-A and ML-B had a benign appearance and were considered to be the equivalent of the so-called melanocytic hyperplasia and nevi described previously (Ackermann et al., 2005). On the other hand, ML-D had typical malignant features and were considered to be equivalent to melanoma. ML-C appeared to be morphologically intermediate between nevi and melanoma, and were therefore difficult to categorize as benign or malignant. It is crucial to precisely

identify this ML-C to correctly interpret changes in modified *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* mice. From ML-A to ML-D, there was a morphological progression characterized by both increase in size of lesions and cells, change in shape of cells from spindle to plump and epithelioid, increased atypias, mitotic index and vascularization, and a trend towards a loss of pigmentation. Furthermore, a chronological progression was also observed with ML-A being the first lesion to appear in young animals and ML-D being the ultimate lesion to develop in adults. We also noticed that the frequency of lesions decreased from ML-A to ML-D. All in all, these data strongly suggest that the sequence from ML-A to ML-D not only represents a morphological and chronological spectrum but also the multistep sequence of progression of ML in the *Tyr::NRas^{Q61K}* mice. This is further supported by the presence of lesions with intermediate features that could not be assigned to a definitive type (transition forms).

Comparison with human pathology revealed that ML in this model had similar features to the blue nevus family although exact equivalence, in terms of pathogenesis, morphology and clinical behavior may not be complete. In this analogy, ML-A, ML-B, ML-C and ML-D would correspond to classical blue nevus, epithelioid blue nevus, atypical blue nevus and malignant blue nevus respectively. One of the most common locations of these tumors in humans is the scalp (Zembowicz and Phadke, 2011), reminiscent of fur in animals. Interestingly, atypical blue nevus is a particular entity for which biological behavior is difficult to predict and is part of lesions often referred to as melanocytic tumors of uncertain malignant potential (MELT-UMP) (Barnhill and Gupta, 2009; Murali et al., 2009; Phadke and Zembowicz, 2011; Zembowicz and Phadke, 2011). In *Tyr::CreERT²; Braf^{+V600E}* and *Tyr::CreERT²; Kras^{G12V}* mice models, blue nevi were also described (Dhomen et al., 2009; Milagre et al., 2010). As *Tyr::NRas^{Q61K}* mice, these mice present skin hyperpigmentation in a C57BL/6 background. The tendency of these mice to develop blue nevi type lesions could be due to the predominance of dermal melanocytes. Here, we extend the comparison and provide evidence to link the lesions of *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* mice to the

blue nevi family of lesions in humans. Because *Tyr::NRas^{Q61K}* mice harbor numerous nevi with *NRas* mutations that can progress to melanoma, they were recently reported to be a model for giant congenital nevi (CGN) (Shakhova et al., 2012). Although this comparison is interesting because patients with CGN can develop neuromelanosis (Alikhan et al., 2012) which is reminiscent of the primary cerebral ML observed in these mice, our histological analysis showed that nevi in CGN are morphologically distinct from the ML observed in *Tyr::NRas^{Q61K}* mice.

Mice lacking *Cdkn2a* are reported to develop sarcomas and lymphomas with a rate of 70%, which may cause diagnostic difficulties (Serrano et al., 1996). In our colony however, only 4 out of 26 (15%) *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* mice were diagnosed with non-melanocytic tumors (Data S1) suggesting that additional genes may cooperate with *Cdkn2a* for tumor suppression (Takeuchi et al., 2010). Non-melanocytic tumors can be differentiated from ML by their morphological and immunohistochemical characteristics. The distinction is particularly important with ML-D that tend to be poorly pigmented.

Unexpected results came from the histopathological examination of lymph nodes. Besides typical melanoma metastasis, lesions resembling cutaneous ML and ranging from ML-A-like to ML-D-like were observed in some lymph nodes without associated cutaneous melanoma. We propose different hypotheses to explain these observations: (i) primary nodal ML could develop in the *Tyr::NRas^{Q61K}* model as for other extra cutaneous site (see below); (ii) other ML than ML-D, especially ML-C, could have malignant potential and produce metastasis; (iii) a combination of these hypotheses.

Primary cerebral melanomas were diagnosed. A metastatic nature is considered unlikely because (i) lesions invariably developed in the rostral brain, a typical site for meningeal melanosis in C57BL/6 mice; this specific distribution was previously reported (Lindsay et al., 2011); (ii) unlike metastases, lesions were large and unique rather than small and multifocal; (iii) unlike metastases, lesions appeared to originate from the leptomeninges rather than from vessels at the interface between white and grey matters

(Brat et al., 1999; Das et al., 2010; Kusters-Vandeveldt et al., 2010); 4) lesions were observed in animals without cutaneous melanoma.

Similarly, primary ocular ML, including nevi and melanomas were frequently diagnosed and originated from the choroid where melanocytes normally exist. Infrequently, ML were diagnosed in the spleen, the harderian gland and the epididymis in animals with concurrent cutaneous melanomas (ML-D). Interestingly, a potential primary nature of the lesions could not be ruled out since ectopic melanocytes are present in C57BL/6 mice in the spleen, the heart or the harderian gland (Percy and Barthold, 2007; Yajima and Larue, 2008) as in humans (Plonka et al., 2009). The results suggest that, because extra-cutaneous melanocytes are common in C57BL/6 mice and because all melanocytes harbor the *NRas^{Q61K}* activating mutation in the *Tyr::NRas^{Q61K}* mice, primary ML including melanomas can develop in non-cutaneous sites. Although it is unclear whether ectopic melanocytes are present or not in lymph nodes, we believe that the existence of primary nodal ML should be considered in the *Tyr::NRas^{Q61K}* model. Interestingly, intracapsular primary nodal melanocytic nevi have been described in humans, though they were not reported to progress to melanoma as we observed in the *Tyr::NRas^{Q61K}* model (Dohse and Ferringer, 2010; Holt et al., 2004; Misago et al., 2008).

Accurate histopathological phenotyping of mice models is a challenge (Sellers and Ward, 2012). Accordingly, the *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* model appeared to be much more complex than expected. With at least four types of cutaneous ML identified, this model offers opportunity to study the steps of melanomagenesis. The presence of extra-cutaneous melanocytes harbouring the same mutations as cutaneous melanocytes is responsible for the development of primary extra-cutaneous ML that coexist with primary cutaneous ML and metastases. This feature should not be underestimated and should prompt to practice thorough necropsies. As a typical site for melanophagic infiltration and metastases, and a putative site for primary ML, lymph nodes appear to be the most challenging non-cutaneous site to evaluate. Histopathological evaluation of

lymph node should be systematic and a metastatic status should not be assigned based solely on gross features.

We hope that the proposed classification and atlas will be the basis for a common language between pathologists and researchers of the melanoma community working with *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* transgenic mice. The present classification is intended to evolve with the improvement of the comprehension of the molecular mechanisms of melanomagenesis.

Acknowledgements

We thank C. Koënen for mice care, as well as A. Champeix, R. Nkosi and P. Wattier for histological technical assistance, M. Serrano for providing *Cdkn2a^{-/-}* mice, L. Larue for the backcrosses in C57BL/6J background and V. Hearing for providing the Tyrp1 (PEP-1) antibody. This work was supported by Institut National de la Recherche Agronomique, Agence Nationale de la Recherche Emergence Bio and Association pour la Recherche contre le Cancer grants. CC was granted by Allocation de Recherche MENRT from the French Ministry of Research (2009–2012).

References

- Ackermann, J., Fruttschi, M., Kaloulis, K., Mckee, T., Trumpp, A., and Beer-mann, F. (2005). Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* 65, 4005–4011.
- Alikhan, A., Ibrahimi, O.A., and Eisen, D.B. (2012). Congenital melanocytic nevi: where are we now? Part I. Clinical presentation, epidemiology, pathogenesis, histology, malignant transformation, and neurocutaneous melanosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 67, 495 e1–495 e17; quiz 512–4.
- Barnhill, R.L., and Gupta, K. (2009). Unusual variants of malignant melanoma. *Clin. Dermatol.* 27, 564–587.
- Brat, D.J., Giannini, C., Scheithauer, B.W., and Burger, P.C. (1999). Primary melanocytic neoplasms of the central nervous systems. *Am. J. Surg. Pathol.* 23, 745–754.
- Das, P., Kumar, N., Ahuja, A., Jain, A., Ray, R., Sarkar, C., and Gupta, S.D. (2010). Primary malignant melanoma at unusual sites: an institutional experience.

- rience with review of literature. *Melanoma Res.* 20, 233–239.
- Devitt, B., Liu, W., Salemi, R., Wolfe, R., Kelly, J., Tzen, C.Y., Dobrovic, A., and McArthur, G. (2011). Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. *Pigment Cell. Melanoma. Res.* 24, 666–672.
- Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., Da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. (2009). Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 15, 294–303.
- Dohse, L., and Ferringer, T. (2010). Nodal blue nevus: a pitfall in lymph node biopsies. *J. Cutan. Pathol.* 37, 102–104.
- Ellerhorst, J.A., Greene, V.R., Ekmekcioglu, S. et al. (2011). Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin. Cancer Res.* 17, 229–235.
- Funk, J.O., Schiller, P.I., Barrett, M.T., Wong, D.J., Kind, P., and Sander, C.A. (1998). p16INK4a expression is frequently decreased and associated with 9p21 loss of heterozygosity in sporadic melanoma. *J. Cutan. Pathol.* 25, 291–296.
- Grafstrom, E., Egyhazi, S., Ringborg, U., Hansson, J., and Platz, A. (2005). Biallelic deletions in INK4 in cutaneous melanoma are common and associated with decreased survival. *Clin. Cancer Res.* 11, 2991–2997.
- Holt, J.B., Sanguenza, O.P., Levine, E.A., Shen, P., Bergman, S., Geisinger, K.R., and Creager, A.J. (2004). Nodal melanocytic nevi in sentinel lymph nodes. Correlation with melanoma-associated cutaneous nevi. *Am. J. Clin. Pathol.* 121, 58–63.
- Ioachim, H.L. (2009). Dermatopathic lymphadenopathy. In *Lymph node pathology*, H.L., Ioachim, and L.J., Medeiros, eds. (Philadelphia: Lippincott & Williams & Williams), pp. 223–226.
- Kusters-Vandeveld, H.V., Klaasen, A., Kusters, B., Groenen, P.J., Van Engen-Van Grunsven, I.A., Van Dijk, M.R., Reifemberger, G., Wesseling, P., and Blokx, W.A. (2010). Activating mutations of the GNAQ gene: a frequent event in primary melanocytic neoplasms of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 119, 317–323.
- Lee, J.H., Choi, J.W., and Kim, Y.S. (2011). Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br. J. Dermatol.* 164, 776–784.
- Lindsay, C.R., Lawn, S., Campbell, A.D. et al. (2011). P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis. *Nat. Commun.* 2, 555.
- Milagre, C., Dhomen, N., Geyer, F.C., Hayward, R., Lambros, M., Reis-Filho, J.S., and Marais, R. (2010). A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS. *Cancer Res.* 70, 5549–5557.
- Misago, N., Nagase, K., Toda, S., Shinoda, Y., Koba, S., and Narisawa, Y. (2008). Cellular blue nevus with nevus cells in a sentinel lymph node. *Eur. J. Dermatol.* 18, 586–589.
- Murali, R., McCarthy, S.W., and Scolyer, R.A. (2009). Blue nevi and related lesions: a review highlighting atypical and newly described variants, distinguishing features and diagnostic pitfalls. *Adv. Anat. Pathol.* 16, 365–382.
- Percy, D.H., and Barthold, S.W. (2007). Introduction. In *The mouse*, B.P., Professional, ed. (Ames, IA: Blackwell Publishing), pp. 4–6.
- Phadke, P.A., and Zembowicz, A. (2011). Blue nevi and related tumors. *Clin. Lab. Med.* 31, 345–358.
- Plonka, P.M., Passeron, T., Brenner, M. et al. (2009). What are melanocytes really doing all day long.? *Exp. Dermatol.* 18, 799–819.
- Sellers, R.S., and Ward, J.M. (2012). Toward a better understanding of mouse models of disease. *Vet. Pathol.* 49, 4.
- Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., and Depinho, R.A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85, 27–37.
- Shakhova, O., Zingg, D., Schaefer, S.M. et al. (2012). Sox10 promotes the formation and maintenance of giant congenital naevi and melanoma. *Nat. Cell Biol.* 14, 882–890.
- Takeuchi, S., Takahashi, A., Motoi, N. et al. (2010). Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. *Cancer Res.* 70, 9381–9390.
- Walker, G.J., Soyer, H.P., Terzian, T., and Box, N.F. (2011). Modelling melanoma in mice. *Pigment Cell. Melanoma. Res.* 24, 1158–1176.
- Yajima, I., and Larue, L. (2008). The location of heart melanocytes is specified and the level of pigmentation in the heart may correlate with coat color. *Pigment Cell. Melanoma. Res.* 21, 471–476.
- Zembowicz, A., and Phadke, P.A. (2011). Blue nevi and variants: an update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135, 327–336.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Gross features of ML.

Figure S2. Expression of melanocytic markers in non-pigmented ML-D.

Figure S3. Histopathological features of cerebral ML.

Figure S4. Histopathological features of ocular ML.

Figure S5. Pulmonary metastatic melanoma.

Figure S6. Infrequent sites for melanocytic lesions: Epididymis.

Table S1. Frequency of the most common ML encountered in *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* transgenic mice.

Data S1. Materials and methods, supplementary data and figure legends.

Supplementary Data

Histopathological atlas and proposed classification for melanocytic lesions in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* transgenic mice

Campagne C., Reyes-Gomez E., Battistella M., Bernex F., Château-Joubert S., Huet H., Beermann F., Aubin-Houzelstein G. & Egidy G.

Table S1. Frequency of the most common melanocytic lesions (ML) encountered in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* transgenic mice

LESIONS	TOTAL	<i>Tyr ::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{+/-}</i>	<i>Tyr ::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}</i>
CUTANEOUS ML			
Type A/B (nevi)	35/35 (100%)	9/9 (100%)	26/26 (100%)
Type C (atypical nevi)	28/35 (80%)	4/9 (44.4%)	24/26 (92.3%)
Type D (melanoma)	25/35 (71.4%)	7/9 (77.8%)	18/26 (69.2%)
NON-CUTANEOUS ML			
<i>Lymph nodes</i>			
Type A/B-like	14/23 (60.9%)	3/5 (60%)	11/18 (61%)
Type C-like	3/23 (13%)	0/5 (0%)	3/18 (16.7%)
Type D-like (melanoma)	19/23 (82.6%)	5/5 (100%)	14/18 (77.8%)
		2 mice w/o cutaneous melanoma	6 mice w/o cutaneous melanoma
<i>Lung (metastasis)</i>	12/31 (38.7%)	3/9 (33%)	9/22 (40.9%)
<i>Central Nervous System</i>			
Type D-like (melanoma)	10/30 (33.3%)	1/9 (11.1%)	9/20 (45%)
		mouse w/o cutaneous melanoma	4 mice w/o cutaneous melanoma
<i>Eye</i>			
Type A/B-like	6/14 (42.9%)	1/7 (14.3%)	5/7 (71.4%)
Type D-like (melanoma)		0/7 (0%)	3/7 (42.9%)
			One w/o cutaneous melanoma

Figure S1. Gross features of ML

a-c: Cutaneous melanomas (ML-D): Lesions were frequently alopecic and occasionally ulcerated (c). Note the thickening and hyperpigmentation of the skin (a);

d-f: Nodal hypertrophy (lymphadenopathy) and hyperpigmentation: Histopathological examination is necessary to determine the cause: melanophagic infiltration alone (dermatopathic lymphadenopathy) or presence of ML including metastases;

g-i: Pulmonary metastases: Note the variation in size and number of metastases. Occasionally, pulmonary metastases were not grossly detectable;

j-l: Hyperpigmented ML corresponding to primary cerebral melanomas in the rostral region of the brain: Melanoma were visible through the calvarium (j). Brain lesions were large and unique compared to pulmonary metastases (g-i) which were small and multiple.

Figure S2. Expression of melanocytic markers in non-pigmented ML-D

Apotome microscopy of immunofluorescence labelling with (a1) Melan-A and (b1) PEP-1 antibodies in non-pigmented ML-D. A variably bright cytoplasmic red signal is present in non-pigmented cells with clear anisokaryosis. In blue, DAPI nuclear counterstaining. (a2, b2): corresponding brightfields included to evaluate the degree of pigmentation. Bar: 10 μ m.

Figure S3. Histopathological features of cerebral ML

a-b: In young animals, spindle shaped melanocytes with bland nuclei (arrows) were observed in the rostral leptomeninges (meningeal melanosis).

c-d: In older animals, small ML were encountered in the leptomeninges (arrows). In this example, melanocytes resembled that of cutaneous melanoma. Some melanocytes were pigmented (arrowhead in d).

e-f: Cerebral melanoma in an adult mouse. The lesion (e, white asterisks) developed in the rostral region was large and unique, and compressed the cerebral tissue (black asterisks). These features led to a diagnosis of primary cerebral melanoma. Note that the lesion resembled cutaneous melanoma (ML-D) with pseudorosettes formation (arrows). Some melanocytes were pigmented (arrowhead in f).

HES stain. Bars: a, c, e = 100 μ m; b, d, f = 50 μ m; Insert = 1 mm.

Figure S4: Histopathological features of ocular ML

a-c: In young animals, few melanocytes were present in the uvea. In the choroid layer, they formed a thin and regular band beneath the retinal pigmentary epithelium (arrows).

d-f: In older animals, ML were observed. Note the diffuse thickening of the choroid layer (arrows) due to melanocytic proliferation. In this case, the optic nerve (asterisks) was surrounded by ML with features of cutaneous nevi.

g-i: Adult mouse diagnosed with a primary ocular melanoma. The lesion (white asterisk) filled the entire globe. Note that the lesion resembled cutaneous melanoma (ML-D). Black asterisk indicates the harderian gland.

HES stain. Bars: a, d, g = 500 μ m; b, f, h = 50 μ m; c, i = 20 μ m; e = 100 μ m.

Figure S5. Pulmonary metastatic melanoma

a: Metastases were multifocal and could vary in size and shape (arrows). b: Metastases were frequently associated with vessels (asterisks). c: Metastatic cells were variably pigmented and pleomorphic. HES stain. Bars: a = 1 mm; b = 50 μ m; c = 20 μ m.

Figure S6. Infrequent sites for melanocytic lesions: Epididymis

The lesion was well demarcated (a. arrows). Melanocytes had benign morphological features (b. c: arrowheads) and resembled those of cutaneous nevi (ML-B).

HES stain. Bars: a = 200 μ m; b = 50 μ m; c = 20 μ m.

Data S1. Non-melanocytic tumors in *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* mice

Histopathological analysis revealed that 4 out of 26 *Tyr::NRas^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}* mice developed non-melanocytic tumors. Two mice had lymphoma with concurrent cutaneous melanoma. A mouse had muscular hemangiosarcoma with concurrent cutaneous nevi but without cutaneous melanoma. A mouse had fibrosarcoma with concurrent cutaneous melanoma.

Lymphomas appeared as a white intra-abdominal infiltrating mass that was associated with small, white, splenic nodules. On histopathological examination, neoplastic cells were round, non cohesive, medium sized and had a large convoluted nucleus. No pigment, melanophagic infiltration or perivascular pseudorosettes were observed.

Muscular hemangiosarcoma appeared as an ill-demarcated white to tan nodule. On histopathological examination, the lesion was composed of pleomorphic (epithelioid to spindle) cells that formed vascular clefts. Mitoses were frequent. No pigment, melanophagic infiltration or perivascular pseudorosettes were observed.

Fibrosarcoma appeared as an ill-demarcated white mass that infiltrated the thoracic cage. On histopathological examination, the lesion was composed of spindle-shaped cells forming

interlacing bundles, with moderate pleomorphism and rare mitoses. No pigment, melanophagic infiltration or perivascular pseudorosettes were observed.

Materials and Methods

Mice

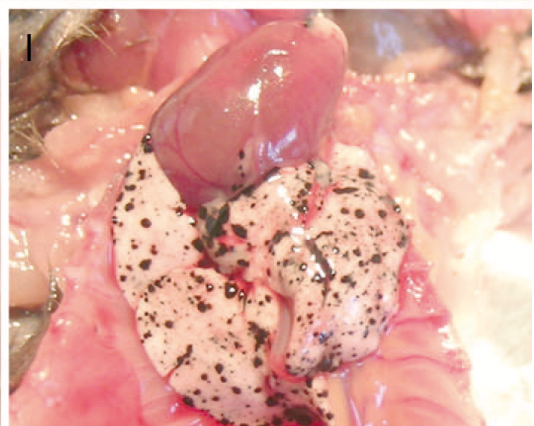
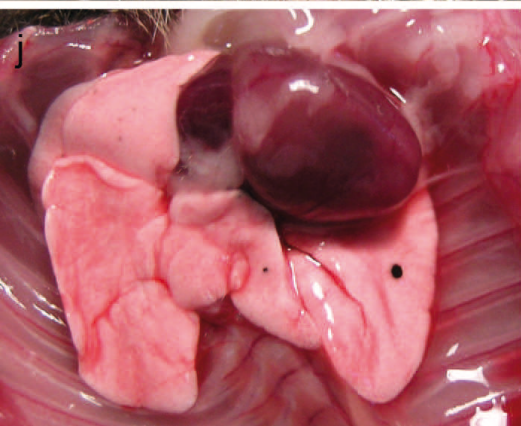
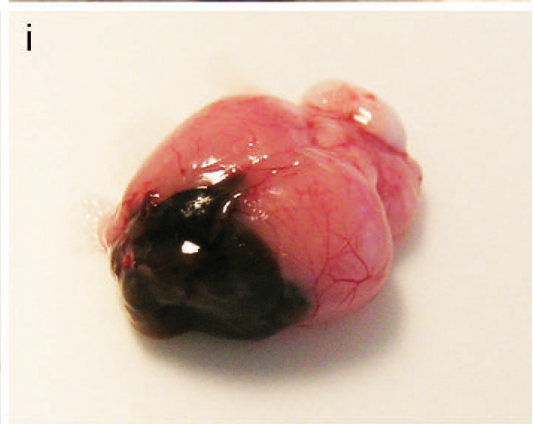
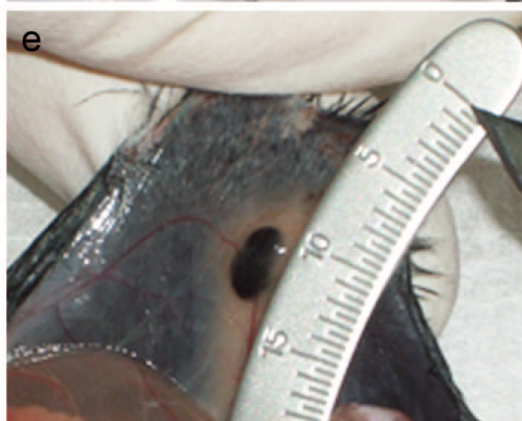
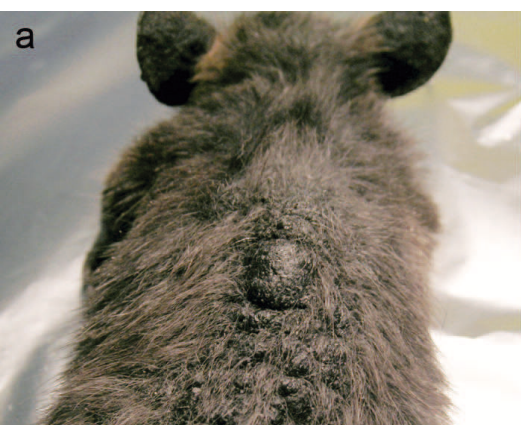
TgN[Tyr::N-Ras^{Q61K}]1Bee mice (referred to as *Tyr::NRas^{Q61K}*) were produced at the ISREC (Ackermann et al., 2005), mated with *Cdkn2a*^{-/-} mice (Serrano et al., 1996) and backcrossed on the C57BL/6J background for more than 15 generations. Animal care and use for this study were approved by the Ethics Committee of the Alfort School of Veterinary Medicine in accordance with European Union Standards.

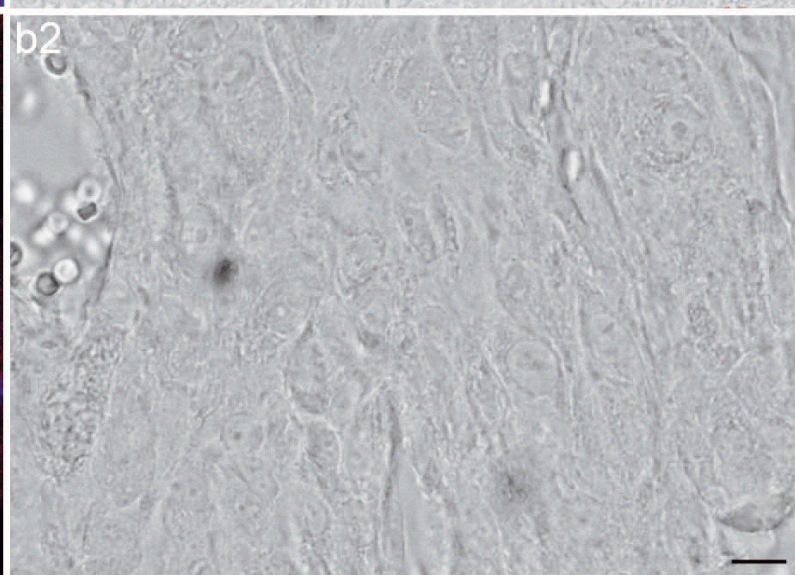
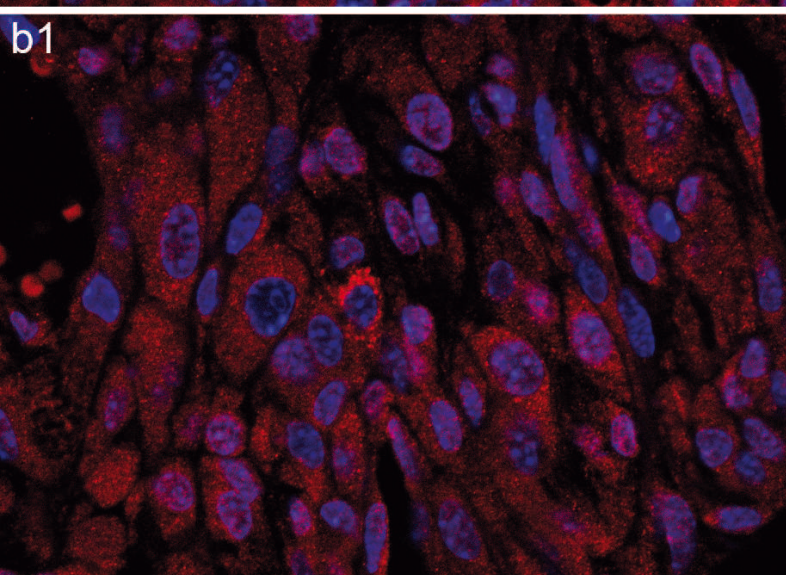
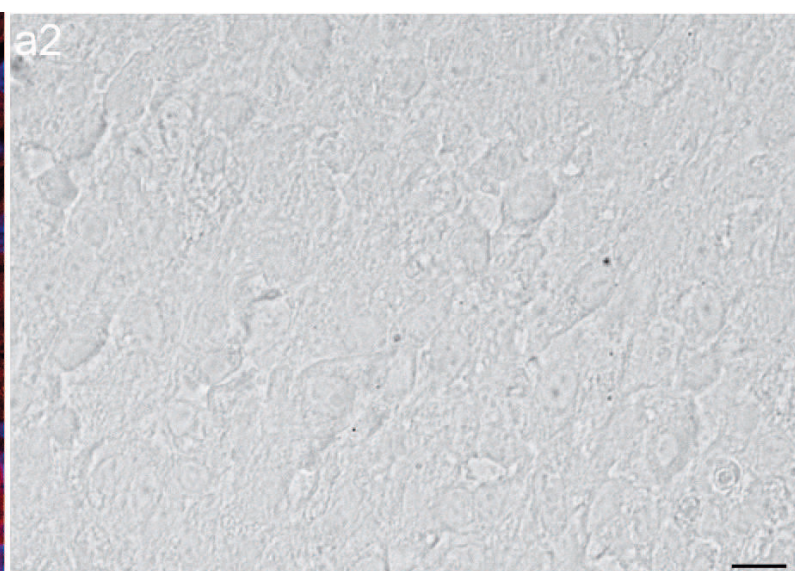
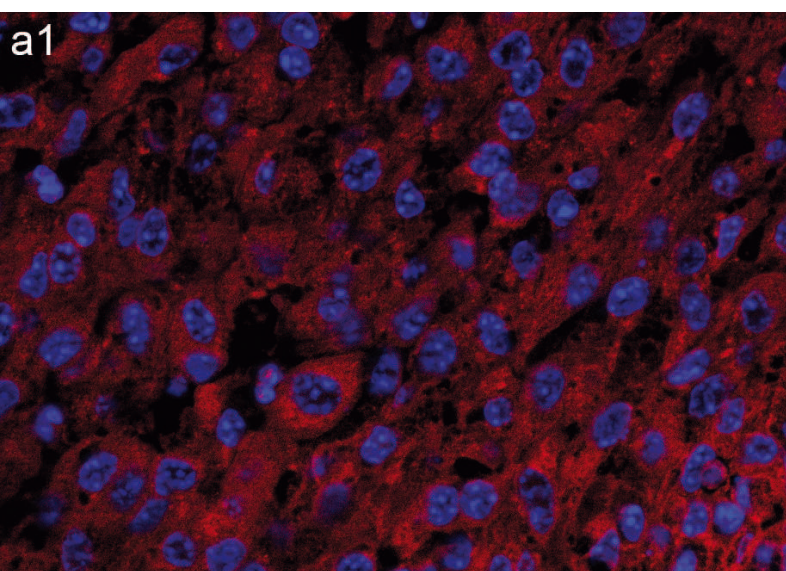
Necropsy and histopathological examination

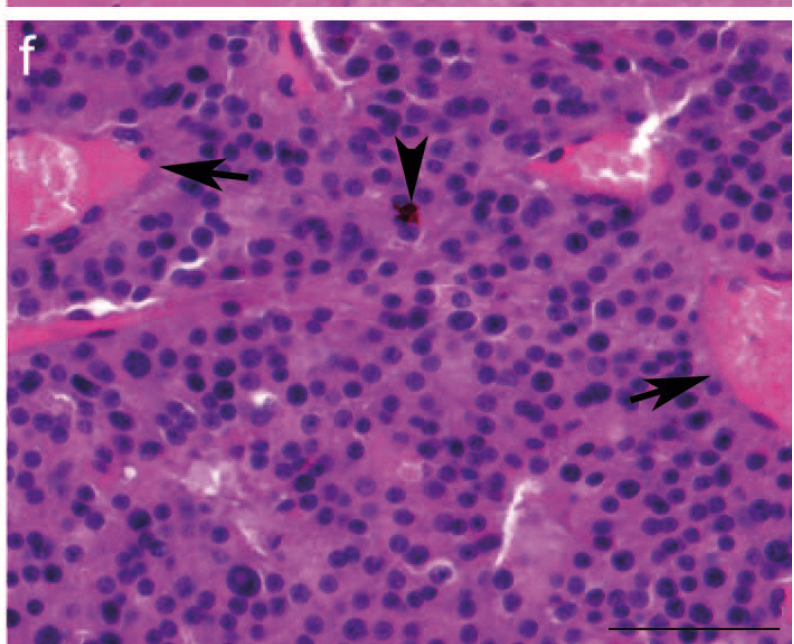
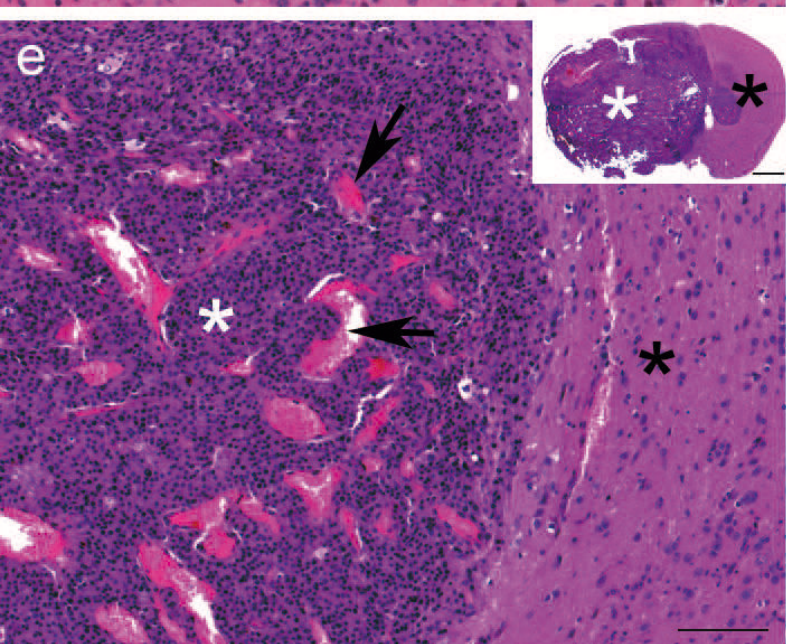
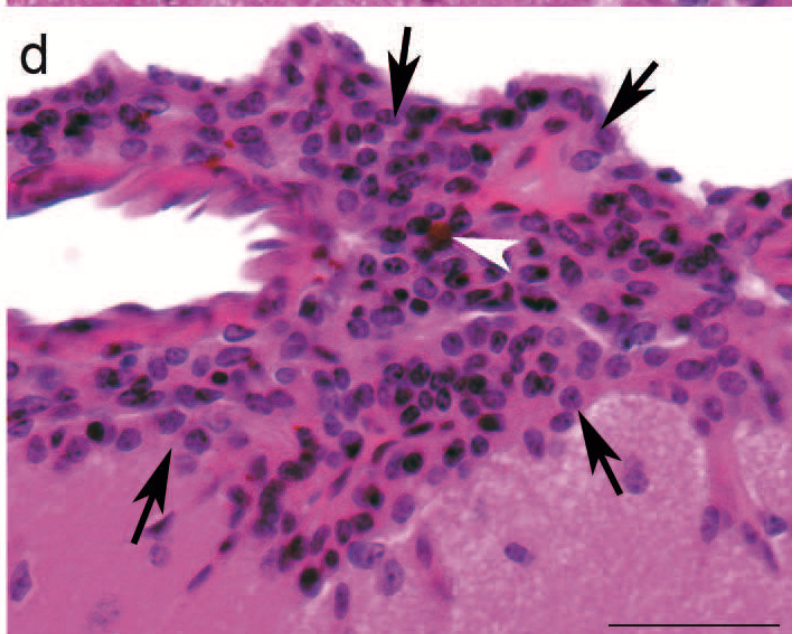
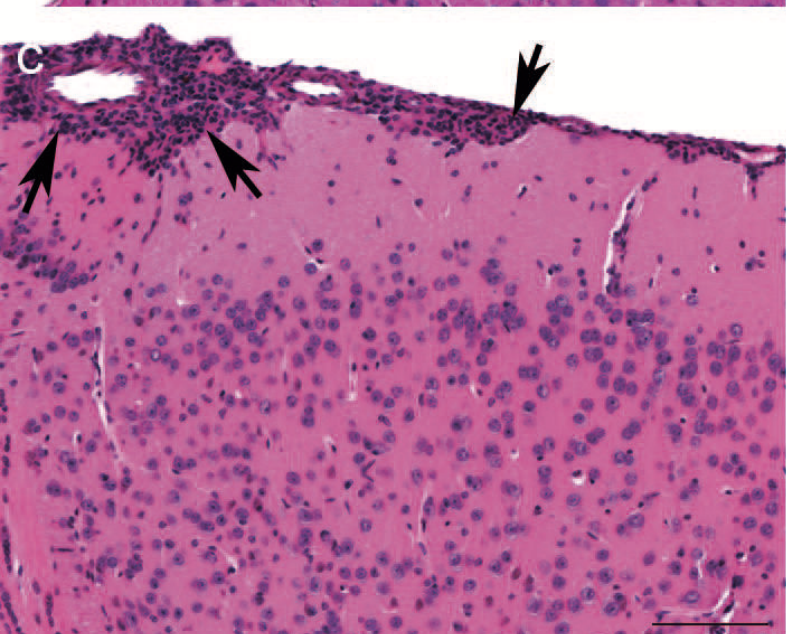
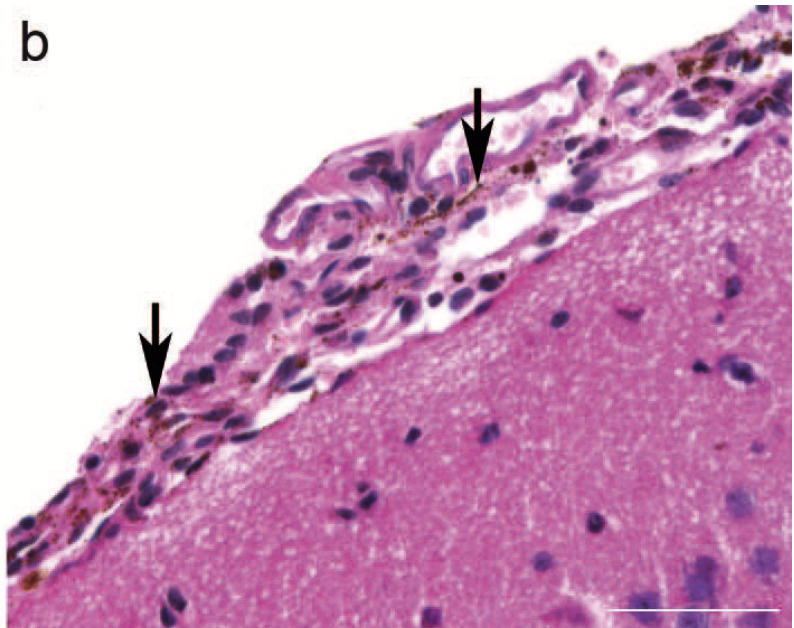
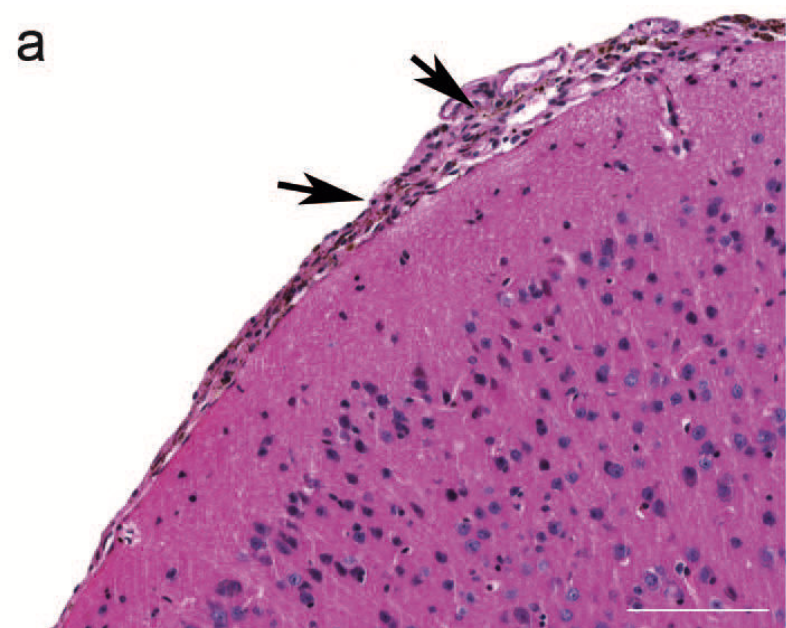
Tyr::NRas^{Q61K} Cdkn2a^{-/-} (13 females and 13 males) and *Tyr::NRas^{Q61K} Cdkn2a*^{+/-} (5 females and 4 males) mice with cutaneous lesions were sacrificed and necropsied serially at 1.5, 3, around 6, 8, 10, 12 and 14 months of age or when they reached one of the end-points i.e. lesion ulceration or progression to 8 mm size as defined in the protocol approved by the Ethics Committee. Mice at post-natal day 21 (P21) and mice without gross melanocytic cutaneous lesions were sacrificed and necropsied as age controls.

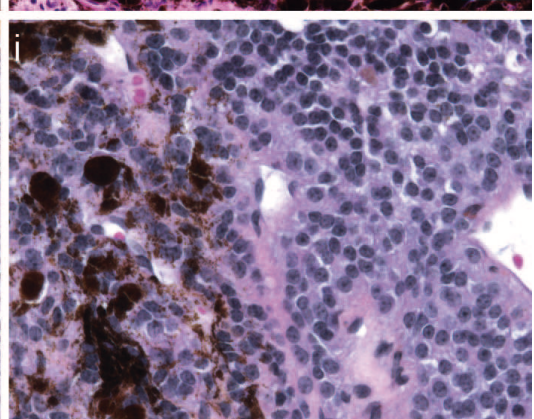
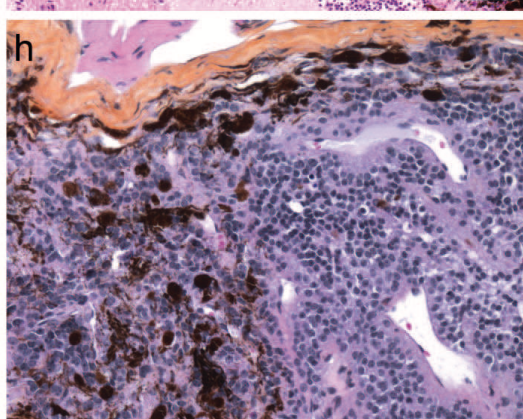
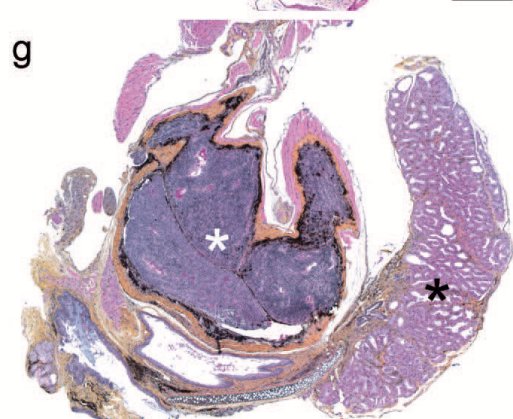
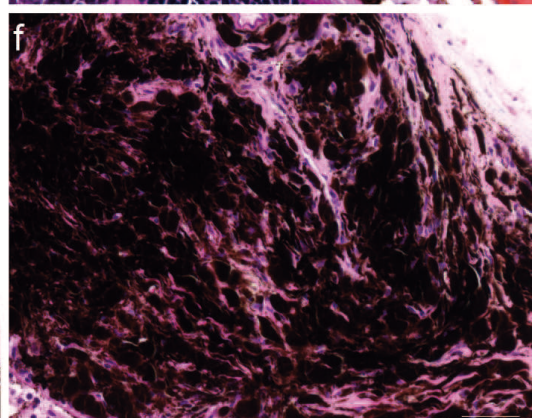
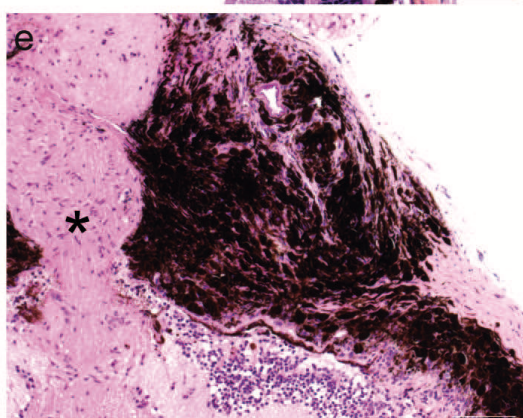
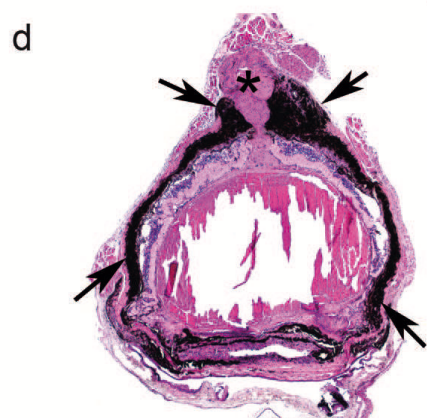
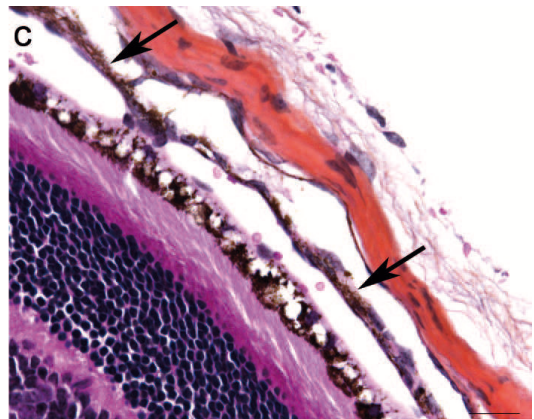
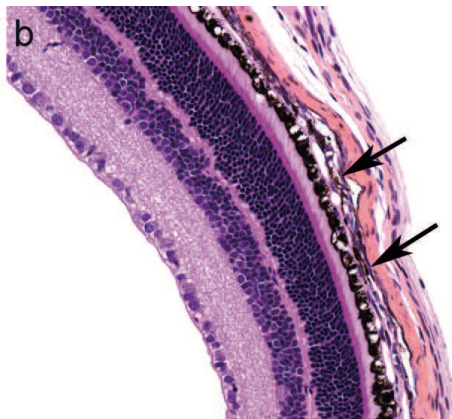
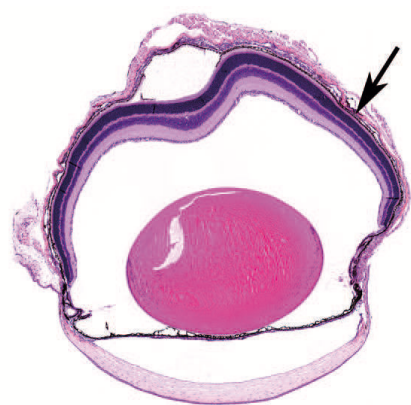
Immediately after euthanasia by conventional ketamine/xylazine anesthesia and section of the aorta, a thorough necropsy was performed. Gross findings were registered and organs including subiliac lymph nodes, proper accessory axillary lymph nodes, superficial lymph nodes of the neck, lungs, brain, eyes, as well as dorsal, ventral and tail skin were systematically sampled. Dorsal skin was removed from the bottom of the neck to the tail insertion between limbs insertion sites. When grossly atypical, with modified size, shape or color, other organs (hearts, liver, epididymis, guts) were also sampled. Tissues were routinely fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C with agitation. All tissues were paraffin embedded, sectioned at 4 µm, mounted on positively charged glass slides (Superfrost Plus, Fisher Scientific) and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES). Histopathologic examination was performed by a veterinary pathologist (ERG) and reviewed with a MD dermatopathologist (MB) for comparison to human melanocytic lesions. Photographs were made using an Imager Z.1 microscope (Carl Zeiss, France) and AxioVision 4.6.3. SP1 software (Carl Zeiss, France). Immunofluorescence on tumors was performed with Melan-A Ab-4 ready-to-use (Thermo Scientific) and Tyrp1 (PEP-1) (1:500). Sections were examined

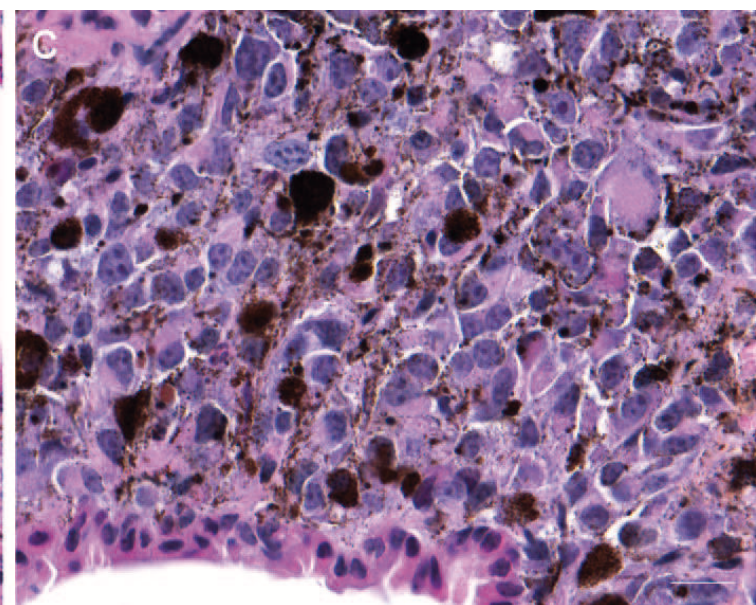
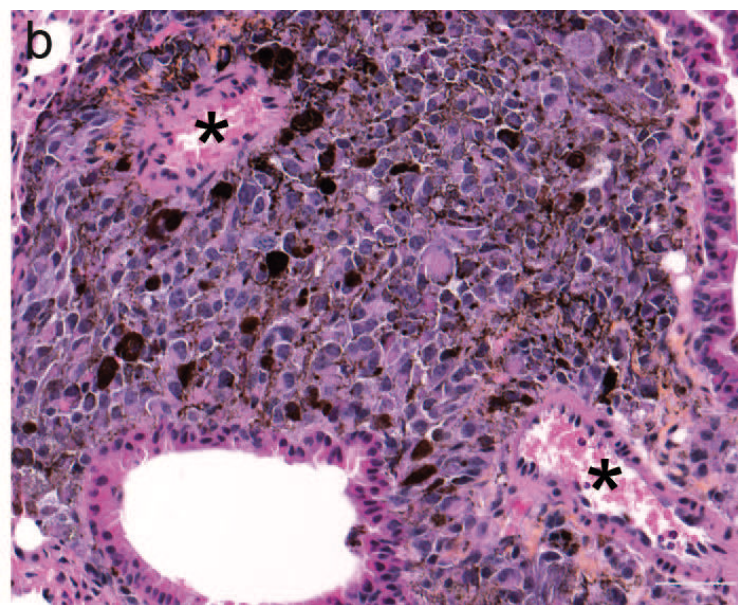
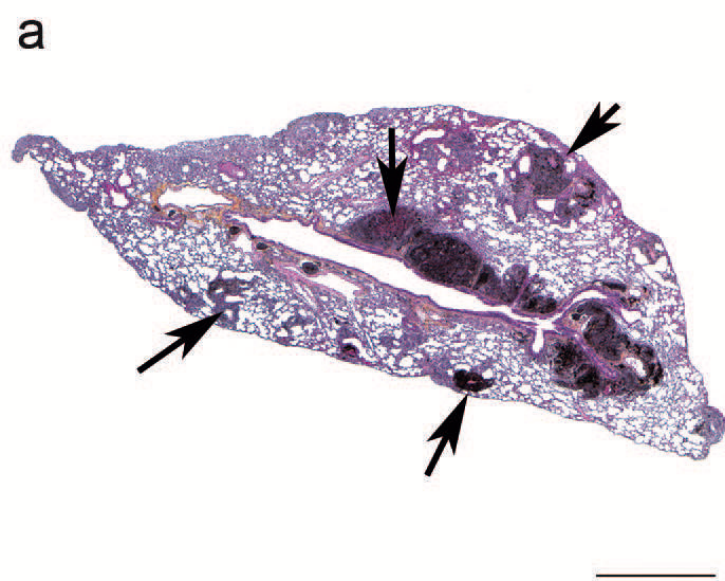
with a Zeiss Axio Observer ZIM ApoTome microscope. Images shown are individual sections of z series stacks.

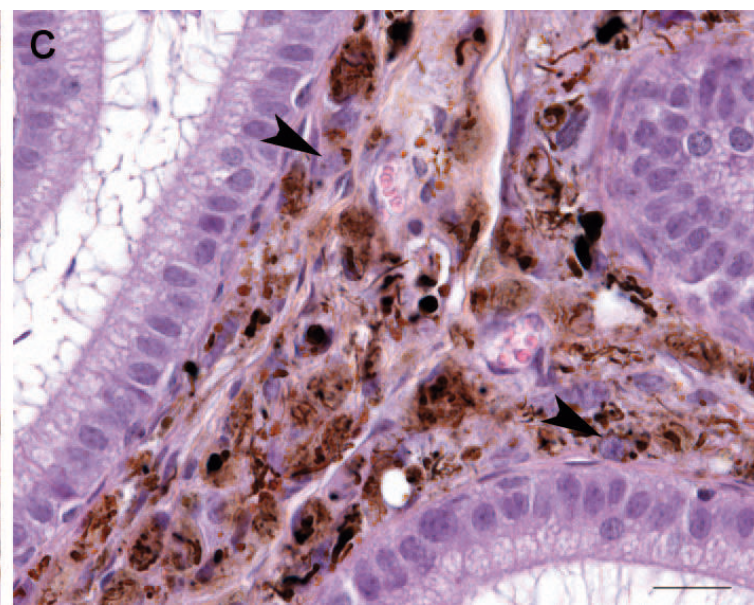
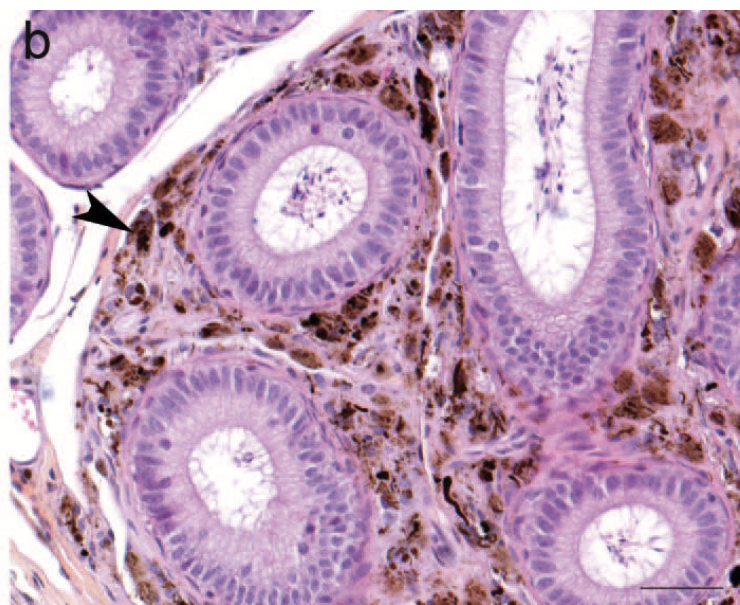
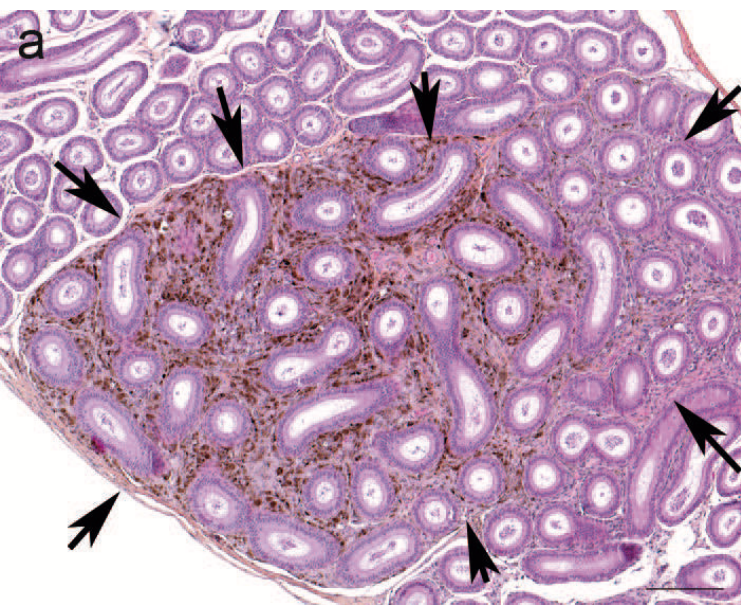












B - Utilisation de la lignée *Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}* pour étudier le rôle de PAX3 dans la progression du mélanome

Le phénotype de la lignée *Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}* ayant été caractérisé, nous avons pu étudier ce modèle dans d'autres contextes.

PAX3 est exprimé dans certains cancers dont les mélanomes (He *et al.*, 2010; Scholl *et al.*, 2001). Nous avons cherché à étudier quel pouvait être son rôle dans la progression tumorale. Nous avons pour cela valorisé l'allèle *Pax3^{GFP/+}*, que nous avons précédemment validé comme outil de visualisation du lignage mélanocytaire, en produisant des souris *Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-} ; Pax3^{GFP/+}*. Nous avons ainsi pu d'une part visualiser les cellules tumorales grâce à l'eGFP mais également analyser l'haploinsuffisance de *Pax3* dans ce modèle.

Nous n'avons observé aucune différence tant dans la morphologie des lésions que dans la latence d'apparition, la pénétrance et l'incidence des métastases entre le groupe contrôle *Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}* et le groupe *Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-} ; Pax3^{GFP/+}*.

C - Utilisation de la lignée *Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}* pour étudier le rôle de RACK1 dans la progression du mélanome

La protéine RACK1 est une protéine échafaudage impliquée dans l'intégration de différentes voies de signalisation (Adams *et al.*, 2011). RACK1 a été identifiée dans notre laboratoire comme un marqueur de malignité des mélanomes cutanés et métastatiques. Elle est exprimée à niveau élevée dans les mélanomes cutanés et leurs métastases mais n'est pas détectée dans les mélanocytes normaux de l'épiderme ni dans les naevi (Egidy *et al.*, 2008).

Au cours de sa thèse, Cécile Campagne a étudié l'implication de RACK1 dans la progression du mélanome. Elle a notamment produit des souris transgéniques *Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-} ; Tyr::Rack1-HA* surexprimant RACK1 dans le lignage mélanocytaire afin d'étudier l'effet de cette surexpression sur le développement de mélanomes dans ce modèle. Nous avons ainsi pu tirer parti de notre caractérisation de la lignée *Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}* pour établir que la surexpression de RACK1 chez les souris *Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-} ; Tyr::Rack1-HA* réduisait la latence des mélanomes mais augmentait leur incidence ainsi que celle des métastases. Ceci nous a permis de démontrer *in vivo* un rôle oncogénique de RACK1 dans la progression du mélanome dans ce modèle.

Les études du rôle de PAX3 et de RACK1 dans la progression du mélanome *via* le modèle *Tyr::NRAS^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}* ont abouti à deux articles en préparation qui figurent ci-après. Dans ces travaux, j'ai comme précédemment pratiqué l'analyse histopathologique de toutes les lésions dont j'ai comparé la morphologie au référentiel établi dans l'article 2.

ARTICLE 3

Metastasizing melanoma development in $Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}$ mice allows melanoma cells monitoring on GFP

(En préparation)

Metastasizing melanoma development in *Tyr::NRas^{Q61K}*; *Cdkn2a*^{-/-}; *Pax3*^{GFP/+} mice allows melanoma cells monitoring on GFP

Campagne C^{1,2}, Reyes-Gomez E^{1,2,3}, Julé S^{1,2,§}, Gadin-Czerw S^{1,2}, Bernex F^{1,2,3,Ψ}, Abitbol M^{1,2}, Louise A⁴, Beermann F⁵, Panthier JJ^{1,2,6}, Aubin-Houzelstein G^{1,2,6} & Egidy G^{1,2,6,*}.

1 INRA, UMR955 de Génétique fonctionnelle et médicale, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, Maisons-Alfort, F-94704 France.

2 Université Paris Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, Maisons-Alfort, F-94704 France.

3 Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité d'Embryologie, d'Histologie et d'Anatomie pathologique, 7 avenue de Général de Gaulle, Maisons-Alfort, F-94704 France.

4 Plate-forme de Cytométrie, Département d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, France

5 ISREC, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

6 Institut Pasteur, Unité de Génétique Fonctionnelle de la Souris; CNRS URA 2578, Département de Biologie du Développement, USC INRA, 25 rue du Dr. Roux, Paris, F-75724 France.

§ Current address: CRC – UMRS 872, 15 rue de l'Ecole de Médecine, Paris 393 F-75006, France.

Ψ Current address: RHEM- Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U896, Centre de Lutte contre Le Cancer Paul Lamarque Val d'Aurelle, Montpellier, F-34298, France.

**Corresponding author: G. Egidy, e-mail: gegidy@vet-alfort.fr, tel: +33 143 967 002, fax: +33 143 967 169*

Short title: Melanoma purification with the *Pax3*^{GFP} allele

Abbreviations: DM, Distant metastasis –ERK, Extracellular signal-regulated kinase – FACS, fluorescent activated cell sorting – GFP, Green Fluorescent Protein – HES, haematoxylineosin-saffron – LR, loco-regional metastasis – MAPK, Mitogen-activated protein kinase – Pax3, Paired box 3 – pERK, phospho-ERK – PM, primary melanoma — Tyr, Tyrosinase.

Abstract

Cutaneous melanoma, the most aggressive form of skin cancer, arises from cutaneous melanocytes. The Paired box 3 (PAX3) transcription factor regulates melanocyte specification from neural crest cells during development. While PAX3 is known to regulate melanocyte differentiation, survival, proliferation and migration during development, its function in melanoma development is not well understood. *In vitro* data suggest that PAX3 may contribute to melanomagenesis. Moreover, PAX3 found highly expressed in melanomas and naevi is considered a marker for melanoma detection. In order to assess the role of *Pax3* in melanoma development *in vivo*, we analyzed haploinsufficiency for *Pax3* in a mouse model of melanoma predisposition. We show that a reduction of half of *Pax3* mRNA and PAX3 protein in melanoma neither delayed nor reduced the incidence or the metastatic rate in *NRAS*^{Q61K}-driven melanocyte transformation on a *Cdkn2a*^{-/-} background. We found no evidence to support a quantitative effect of PAX3 in this model of melanomagenesis. Noteworthy, *Pax3*^{GFP} allele was a convenient marker to identify and directly sort melanoma cells within the tumor bulk at each stage of melanoma progression. This new mouse model represents an accurate and reproducible means for *in vivo* melanoma cell monitoring to study mechanisms of melanoma development.

Key words: melanoma, PAX3, mouse models, primary culture, direct FACS-sorting, immunohistology.

Introduction

The Paired box 3 (PAX3) transcription factor is a key regulator of melanocyte development during embryogenesis (Lang *et al.*, 2005). It is extensively expressed in melanoblasts and normal melanocytes, as well as in neoplastic melanocytes of melanocytic nevi and melanomas (He *et al.*, 2010b). Interestingly, *PAX3* expressed by muscle progenitors is re-expressed in rhabdomyosarcomas and Ewing's sarcoma (Scholl *et al.*, 2001) suggesting that it may play a role in tumoral progression. Consistent with this hypothesis, PAX3 was shown to modulate the mRNA levels of genes involved in differentiation, proliferation and cell survival in melanoma cell lines (Medic *et al.*, 2011). In addition, PAX3-specific RNA interference was shown to induce terminal differentiation, to reduce proliferation and to induce apoptosis via caspase-3 or p53 activation in melanoma cell lines (He *et al.*, 2010a; He *et al.*, 2005; Scholl *et al.*, 2001). Thus, *in vitro* data lead one to believe that PAX3 may contribute to melanoma development and progression. In order to assess the role of *Pax3* in melanoma development *in vivo*, we analyzed haploinsufficiency for *Pax3* in a model of melanoma predisposition. We mated *Pax3*^{GFP/+} knock-in mice with *Tyr::NRAS*^{Q61K}; *Cdkn2a*^{-/-} transgenic mice. In *Pax3*^{GFP/+} mice, the reporter gene *GFP* is inserted in the first exon of the *Pax3* gene leading to a *Pax3* null allele with GFP expression in PAX3-positive cells (Relaix *et al.*, 2005). *Tyr::NRAS*^{Q61K}; *Cdkn2a*^{-/-} transgenic mice are among the most widely used models of cutaneous metastasizing melanomas (Ackermann *et al.*, 2005). We postulated that the *Pax3*^{GFP} allele would delay *NRAS*^{Q61K}-driven melanocyte transformation and tumor formation, or reduce the metastatic process. In contrast, *Tyr::NRas*^{Q61K}; *Cdkn2a*^{-/-}; *Pax3*^{GFP/+} mice developed cutaneous metastasizing melanoma with clinical features similar to the ones of the *Tyr::NRas*^{Q61K};

Cdkn2a^{-/-}; *Pax3*^{+/+} control group. As a consequence, we tested whether *Pax3*^{GFP} allele was a convenient marker to identify and sort melanoma cells within the tumor bulk with fluorescent activated cell sorting (FACS). Our isolation protocol resulted in primary culture of melanocytic cells from healthy melanocyte to melanoma cells from distant metastases through primary melanoma and locoregional metastases. Sorted cells kept the specific *in vitro* and *in vivo* properties of their stage of origin. Present data show that the *Pax3*^{GFP} allele is a useful marker of melanoma cells in this mouse model.

Results and discussion

Generation of *Tyr::NRas*^{Q61K}; *Cdkn2a*^{-/-}; *Pax3*^{GFP/+} mice

Pax3^{GFP/+} mice exhibit a coat color characterized by a variably-sized belly spot, with white extremities of the tail and paws reflecting defective melanoblast migration (Figure 1a) as observed in heterozygous *Spitch* (*Pax3*^{Sp/+}) mice (Hornyak *et al.*, 2001). We mated *Pax3*^{GFP/+} knock-in mice with *Tyr::NRAS*^{Q61K}; *Cdkn2a*^{-/-} transgenic mice that exhibit skin hyperpigmentation (Figure 1b). *Tyr::NRAS*^{Q61K}; *Cdkn2a*^{-/-}; *Pax3*^{GFP/+} mice were viable, fertile and exhibited a compound phenotype, with skin hyperpigmentation due to transgenic *N-RAS*^{Q61K} expression and white spots on the belly and extremities caused by *Pax3* haploinsufficiency (Figure 1c). This phenotype suggests an absence of genetic interaction between *Pax3* and *Tyrosinase* (*Tyr*) gene regulation. Noteworthy, *Pax3* transcripts are first detected in day 8.5 mouse embryos in the dorsal-most cells of the neuroepithelium (Goulding *et al.*, 1991), whereas the *Tyr* gene is expressed at later stages around midgestation (Loftus *et al.*, 2009). PAX3 does not participate in *Tyr* gene transcription directly (Galibert *et al.*, 1999) or indirectly (He *et al.*, 2010a).

Melanomagenesis is not altered in *Tyr::NRas*^{Q61K}; *Cdkn2a*^{-/-}; *Pax3*^{GFP/+} mice

Complete necropsy and systematic pathological analysis were performed on *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* and *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{+/+}* control mice. All mice developed the spectrum of dermal melanocytic proliferation previously identified in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{+/+}* ranging from melanocytic naevi to melanomas and lung metastases (Figure 1d-f) (Campagne *et al.*, 2013). No differences in melanoma clinical features – colour, size and sites – were identified between the two groups. No significant differences in latency or in primary tumour and metastases incidence were seen between the two groups over 14 months (Figure 2a, b).

Pax3 mRNA and PAX3 protein levels were evaluated in primary melanomas from *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* and *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{+/+}* control mice. Quantifications confirmed a reduction by half of *Pax3* transcript and PAX3 protein in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* mice melanomas (Figure 2c). These data suggest that no PAX3 compensation took place in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* mice melanomas to allow melanomagenesis. *NRAS^{Q61K}* causes constitutive activation of the NRAS protein leading to extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation (Ackermann *et al.*, 2005). Phospho-ERK signal was detected on both *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* and control melanomas suggesting no modification in the ERK pathway in transformed melanocytic cells (Figure S1). Thus, removing one functional copy of *Pax3* still allowed metastasizing melanoma development in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* mice. Alternatively, PAX3 could have a stimulatory effect on melanoma through an MDM2-mediated ubiquitination of p53 as shown in mouse embryonic stem cells induced to form neuronal precursors (Wang *et al.*, 2011). In that case, the present model with *Cdkn2a* locus inactivation would not reveal such interactions.

We have recently shown that the *Pax3^{GFP}* allele provides a valuable reporter to identify melanocytes and their precursors in hair follicle biopsies and tissue sections based on GFP

expression (Djian-Zaouche *et al.*, 2012). Accordingly, $Pax3^{GFP/+}$ melanoma cells were also identified by direct fluorescence. The GFP signal was strong in the nucleus, and fainter in the cytoplasm (Figure 3a). In melanoma sections, PAX3 and GFP were colocalized by immunofluorescence (Figure 3b, c) as for melanocytes.

Characterization of FACS-sorted melanoma cells.

Next, we tested whether the $Pax3^{GFP}$ allele was useful to isolate melanoma cells at different progression stages. To obtain pure primary cultures of melanoma cells, we FACS-sorted on GFP dissociated tumors from primary melanoma (PM), locoregional metastasis (LR), and distant metastasis (DM) that had developed in $Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}$ mice (Figure 4a). Primary cultures of FACS-sorted melanocytes were obtained from back skin of newborn pups with the same genotype as controls. Heterogeneous melanoma primary cultures, representative of the melanoma cells in the tumor bulks were obtained (Figure 4a). Importantly, $Cdkn2a$ locus deletion avoided senescence of the primary cultures (Sviderskaya *et al.*, 2002). In $Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}$ primary cultures, constitutive ERK activation was detected in all cells as expected (Figure 4b).

We analyzed in detail the three primary cultures established from PM, LR, and DM tissues. The invasive properties were evaluated both *in vitro* and *in vivo*. Anchorage independent growth assay in soft agar resulted in colonies within 12 days for all melanoma cells while control primary cultures of melanocytes from neonatal skin did not proliferate (Figure 4c). Cell migration, measured using a modified Boyden chamber assay, was positive for melanoma cells in contrast to control melanocytes. Quantification of migrating cells showed an increase of invasive properties of melanoma cells from PM, LR, and DM tissues significantly related to their melanoma progression stage (Student t test; $p < 0,05$, Figure 4d). Finally, to test invasive capacities *in vivo*, melanocytic tumoral cells from primary cultures

from PM, LR, and DM tissues were retro-orbitally injected to syngeneic C57BL/6J mice. Their lungs were analyzed two weeks later. GFP-positive micrometastases were found in one out of three mice injected with PM cells and in four out of four mice injected with either LR or DM cells (Figure 4e).

All in all, the primary cultures from FACS-sorted GFP-positives cells presented the properties of their tumoral stage of origin. The *Pax3^{GFP}* allele proved to be a sensitive fluorescent reporter of normal and tumoral melanocytic lineage *in vitro* and *in vivo* ((Djian-Zaouche *et al.*, 2012) and herein).

Altogether the *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* model allows easy identification of melanocytes and melanoma cells within tissues without interfering with tumoral progression. The *Pax3^{GFP}* allele will be a useful and powerful tool to study mechanisms of melanoma development *in vivo*.

Materials & Methods

Mice and genotyping. Transgenic *TgN[Tyr::N-RasQ61K]1Bee* (referred to as *Tyr::NRAS^{Q61K}*) were produced at ISREC Institute (Ackermann *et al.*, 2005). *Cdkn2atm4Rdp* mice (referred to as *Cdkn2a^{-/-}*) were produced at the Albert Einstein College of Medicine (Serrano *et al.*, 1996). *Pax3tm4Buck* mice (referred to as *Pax3^{GFP/+}*) mice were produced at Pasteur Institute (Relaix *et al.*, 2005). These three mouse lines have been backcrossed onto the C57BL/6J background for more than 15 generations. Eight week-old C57BL/6J females were used for intravenous injection of tumoral cells. Animal care and use for this study were approved by the ethical board of the Alfort School of Veterinary Medicine in accordance with European Union Standards.

To identify the *Pax3*^{GFP} transgene, the *GFP* sequence was amplified using the following primers: *GFP* forward: 5'-ttgtggcggatcttgaagttcaccttgatgc-3'; *GFP* reverse: 5'-acatgaagcagcagcacttctcaagtccg-3'. PCR conditions were 30 s at 94°C, 30 s at 57°C, 40 s at 72°C for 35 cycles. The primers used to identify the *NRAS*^{Q61K} were: *NRAS* forward: 5'-gatvvaccatagagggatt-3'; *NRAS* reverse: 5'-ctggcgtatttctcttacc-3'. PCR conditions were 1 min at 94°C, 1 min at 56°C, 1 min at 72°C for 4 cycles; 30s at 94°C, 30s at 56°C, 30s at 72°C for 30 cycles. The primers used to identify the *Cdkn2a* locus were: forward 5'-ctatcaggacatagcgttg-3' and reverse: 5'-agtgagagtttgggacagag-3'. PCR conditions were 1min at 94°C, 1 min at 57°C, 1 min at 72°C for 4 cycles; 30s at 94°C, 45s at 57°C, 30s at 72°C for 30 cycles. The primers used to identify the *Cdkn2a* deleted locus were: forward 5'-atgatgatgggcaacgttc-3' and reverse: 5'-gttcccagcggtagacaaaag-3'. PCR conditions were 1 min at 94°C, 1 min at 58°C, 1 min at 72°C for 4 cycles; 30s at 94°C, 45s at 58°C, 30s at 72°C for 30 cycles. All PCR were completed with a final extension step at 72°C for 10 min. Data herein concern 30 *Tyr::NRAS*^{Q61K}; *Cdkn2a*^{-/-}; *Pax3*^{GFP/+} and 45 *Tyr::NRAS*^{Q61K}; *Cdkn2a*^{-/-}; *Pax3*^{+/+} mice.

Histologic analysis and immunofluorescence in mice samples. Complete necropsy, routine hematoxylin-eosin-saffron (HES) staining and systematic pathological analysis were performed on all adult mice involved in this study as previously described¹.

For immunofluorescence analyses, antigen retrieval was performed in citrate buffer, pH 6, for 30 min in a water-bath. Blocking was performed for 1h at RT in 10% normal goat serum, bovine serum albumin 1% in PBS. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Secondary Alexa-fluor antibodies (Invitrogen, 1:400) were incubated for 1h at RT. The sections were then mounted in Vectashield (Vector, Abcys, Courtaboeuf, France). Immunofluorescence was performed with chicken polyclonal anti-GFP (Abcam, 1: 600, Paris, France), rabbit polyclonal anti-PAX3 (Zymed, 1:100, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France),

mouse monoclonal anti-PAX3 (Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:200, Iowa university, Iowa, USA) and rabbit polyclonal anti-pERK (phospho-p42/44 MAPK, 1:100, Cell Signaling, Ozyme, Saint Quentin, France) antibodies. Nuclear counter-staining was achieved with 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:1000, Invitrogen). Sections were examined with a Zeiss Axio Observer Z1M ApoTome microscope (Carl Zeiss S.A.S.; Le Pecq, France). Controls without the first antibodies showed no unspecific labeling. Images were processed with the *AxioVision* computer program version 4.6 (Carl Zeiss). Figures are representative of the skin samples evaluated (n>8 for each line). All images shown are individual sections of z series stack. Final figures were assembled with Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems; USA).

RNA extraction and RT-qPCR. RNA extractions were performed on 10 formalin-fixed paraffin-embedded melanoma samples collected from *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{+/+}* mice (n=5) or *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* mice (n=5) using NucleoSpin FFPE RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) following manufacturer instructions. Reverse transcriptions were performed using Maxima First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, Thermo fisher, Villebon s/ Yvette, France) following the manufacturer's instructions. qPCR were performed using Maxima SYBR green qPCR kit (Fermentas) on a Roche Light Cycler Carousel-based system (Roche). qPCR primers were as follows. PAX3: 5'-tgggcagtatggacaaagtg-3' and 5'-gtggaggccggaaacagg-3' (Blake and Ziman, 2005) and housekeeping gene actin β : 5'-tccacacccgccaccagttc-3' and 5'-gacccattccaccatcacacc-3'. qPCR experiments were carried out at least twice in triplicates.

Protein extractions and western-blot analyses. Before loading on 10% acrylamide gels, proteins were denaturized 5 min at 95°C. Transfer was realized on PVDF membrane. The primary antibodies were rabbit anti-PAX3 (Zymed, 1:1000), rabbit anti-ERK (p42/44 MAPK,

1:1000, Santa Cruz, Ozyme), rabbit anti-pERK and mouse anti- α -tubulin (eBioscience, 1:2000, Paris, France). Quantification was made using ImageJ software.

Fluorescent activated cell sorting (FACS). Melanocytes FACS-sorting protocol for newborn *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* mice was previously described (Djian-Zaouche *et al.*, 2012). Melanoma primary tumors or metastases sampled at necropsy were finely chopped and incubated for 20 min at 37°C under agitation in collagenase type IV (Gibco Invitrogen Cell Culture, Cergy Pontoise, France), liberase TM (Roche, Meylan, France) and DNase (Epicentre, Tebu-bio, Le Perray, France). Supernatant was neutralized in DMEM medium containing 10% FCS and remaining tissues were incubating with new digestion mix for 10 additional minutes. Cell suspensions were filtered, centrifuged and resuspended in PBS, 2mM EDTA. All acquisitions and data analyses were performed with a MoFlo XDP Flow Cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) interfaced to the FlowJo software. Cells were gated for single events and viability then sorted on GFP expression. From 3 to 6 lesions samples were FACS-sorted for each stages of melanoma progression.

Cell culture and immunofluorescence. FACS-sorted melanocytes were cultured without feeder cells as described (Djian-Zaouche *et al.*, 2012). FACS-sorted melanoma cells were plated at 2×10^5 cells/mL in melanoma medium consisting of DMEM supplemented with 10% FCS, 103 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 0,5 μ g/mL fungizone, 10 μ g/mL gentamicin and incubated at 37°C with 5% CO₂. The two first weeks of culture 10 nM cholera toxin and 200 nM 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (Sigma-Aldrich, Lyon, France) were added. Experiments herein used cells trypsinized up to 5 passages from a primary culture at each progression stage. For immunofluorescence, cells were plated onto coverslips for 24h, then fixed 15 min with 2% paraformaldehyde, permeabilized 10 min with methanol and labeling was performed as described above.

Soft agar Assay. Cells (5×10^4 cells/ ml and 5×10^5 cells/ ml) were seeded in Seaplaque agar, adapted for 96-well plates and observed 12 days later, in quintuplicates (Jule *et al.*, 2003). The assay was performed twice.

Modified Boyden chamber assay. Cells (2×10^4 cells/ insert for 24-well plate) were plated onto Matrigel coated cell culture inserts (0.8 μ M pore, R&D-Systems) in minimal DMEM medium with 1% FCS containing DMEM medium in the plate as chemoattractant, in quintuplicates. After 24 hours of incubation, cells on the underside of insert filters were fixed, stained with *cresyl violet* and counted under a bright-field microscope. The assay was performed twice.

In vivo test of tumorigenicity. Syngeneic C57BL/6J mice received 10^6 cells/30 μ L by retro-orbital injection under local anaesthesia: n=3 mice for PM cells, n=4 mice for LM and DM cells. Fifteen days later, mice were euthanased and lungs were histologically and fluorescently examined for micrometastases.

Statistical analysis. All error bars represent standard error of the mean. Mann-Whitney and Student's t tests were used to compare differences between groups. A *p*-value <0.05 was considered as statistically significant.

Conflict of Interest

The authors state no conflict of interest.

Acknowledgments

We would like to thank C. Koënen for mice care, and A. Champeix and P. Wattier for histological technical assistance. We thank S. Mourah and L. Peduto for fruitful discussions, and U. Maskos for careful reviewing of the manuscript. The PAX3 antibody developed by

C.P. Ordahl, was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, USA. This work was supported by Institut National de la Recherche Agronomique, Agence Nationale de la Recherche Emergence Bio and Association pour la Recherche contre le Cancer grants. CC was granted by Allocation de Recherche MENRT from the French Ministry of Research (2009-2012).

References

- Ackermann J, Frutschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F (2005) Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res* 65:4005-11.
- Blake JA, Ziman MR (2005) Pax3 transcripts in melanoblast development. *Development, growth & differentiation* 47:627-35.
- Djian-Zaouche J, Campagne C, Reyes-Gomez E, Gadin-Czerw S, Bernex F, Louise A, *et al.* (2012) Pax3(GFP) ,a new reporter for the melanocyte lineage, highlights novel aspects of PAX3 expression in the skin. *Pigment Cell Melanoma Res.*
- Galibert MD, Yavuzer U, Dexter TJ, Goding CR (1999) Pax3 and regulation of the melanocyte-specific tyrosinase-related protein-1 promoter. *J Biol Chem* 274:26894-900.
- Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR, Gruss P (1991) Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J* 10:1135-47.
- He S, Li CG, Slobbe L, Glover A, Marshall E, Baguley BC, *et al.* (2010a) PAX3 knockdown in metastatic melanoma cell lines does not reduce MITF expression. *Melanoma Res.*
- He S, Yoon HS, Suh BJ, Eccles MR (2010b) PAX3 Is extensively expressed in benign and malignant tissues of the melanocytic lineage in humans. *J Invest Dermatol* 130:1465-8.
- He SJ, Stevens G, Braithwaite AW, Eccles MR (2005) Transfection of melanoma cells with antisense PAX3 oligonucleotides additively complements cisplatin-induced cytotoxicity. *Mol Cancer Ther* 4:996-1003.
- Hornyak TJ, Hayes DJ, Chiu LY, Ziff EB (2001) Transcription factors in melanocyte development: distinct roles for Pax-3 and Mitf. *Mech Dev* 101:47-59.
- Jule S, Bosse P, Egidy G, Panthier JJ (2003) Establishment and characterization of a normal melanocyte cell line derived from pig skin. *Pigment Cell Res* 16:407-10.
- Lang D, Lu MM, Huang L, Engleka KA, Zhang M, Chu EY, *et al.* (2005) Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature* 433:884-7.
- Loftus SK, Baxter LL, Buac K, Watkins-Chow DE, Larson DM, Pavan WJ (2009) Comparison of melanoblast expression patterns identifies distinct classes of genes. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:611-22.

Medic S, Rizos H, Ziman M (2011) Differential PAX3 functions in normal skin melanocytes and melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 411:832-7.

Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M (2005) A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435:948-53.

Scholl FA, Kamarashev J, Murmann OV, Geertsen R, Dummer R, Schafer BW (2001) PAX3 is expressed in human melanomas and contributes to tumor cell survival. *Cancer Res* 61:823-6.

Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA (1996) Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85:27-37.

Sviderskaya EV, Hill SP, Evans-Whipp TJ, Chin L, Orlow SJ, Easty DJ, *et al.* (2002) p16(Ink4a) in melanocyte senescence and differentiation. *J Natl Cancer Inst* 94:446-54.

Wang XD, Morgan SC, Loeken MR (2011) Pax3 stimulates p53 ubiquitination and degradation independent of transcription. *PLoS One* 6:e29379.

Figure legends

Figure 1. *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* mice develop metastasizing melanoma

a-c: Phenotype of (a) *Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* mice presenting white belly spot white feet and tail tip (arrows), (b) *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{+/+}* littermates with hyperpigmented skin (arrowheads) and (c) *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* littermates harboring a compound phenotype (arrows, arrowheads). **d-f:** Histological features (HES) of melanocytic nevi (d), primary melanoma (e) and lung metastases (f) in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{+/+}* control (1) and *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* mice (2). Lesions are histologically indistinguishable among groups. Bars: (d) 200µm; (e) 50µm and 5mm (insert); (f) 100µm.

Figure 2. Melanoma latency and incidence are maintained with a tumoral reduction of *Pax3* mRNA and PAX3 protein

a-b: Kaplan-Meier survival curves (a), lung metastases incidence (b) in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* (grey, n=30) and in control mice (white, n=45), **c:** *Pax3* mRNA and PAX3 protein levels in primary melanomas from *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* (grey) and control mice (white). The PAX3:α-tubulin ratio shows that tumors with the *Pax3^{GFP/+}* allele develop with half of PAX3 protein levels.

Figure 3. *Pax3^{GFP}* allow melanoma cells identification on GFP.

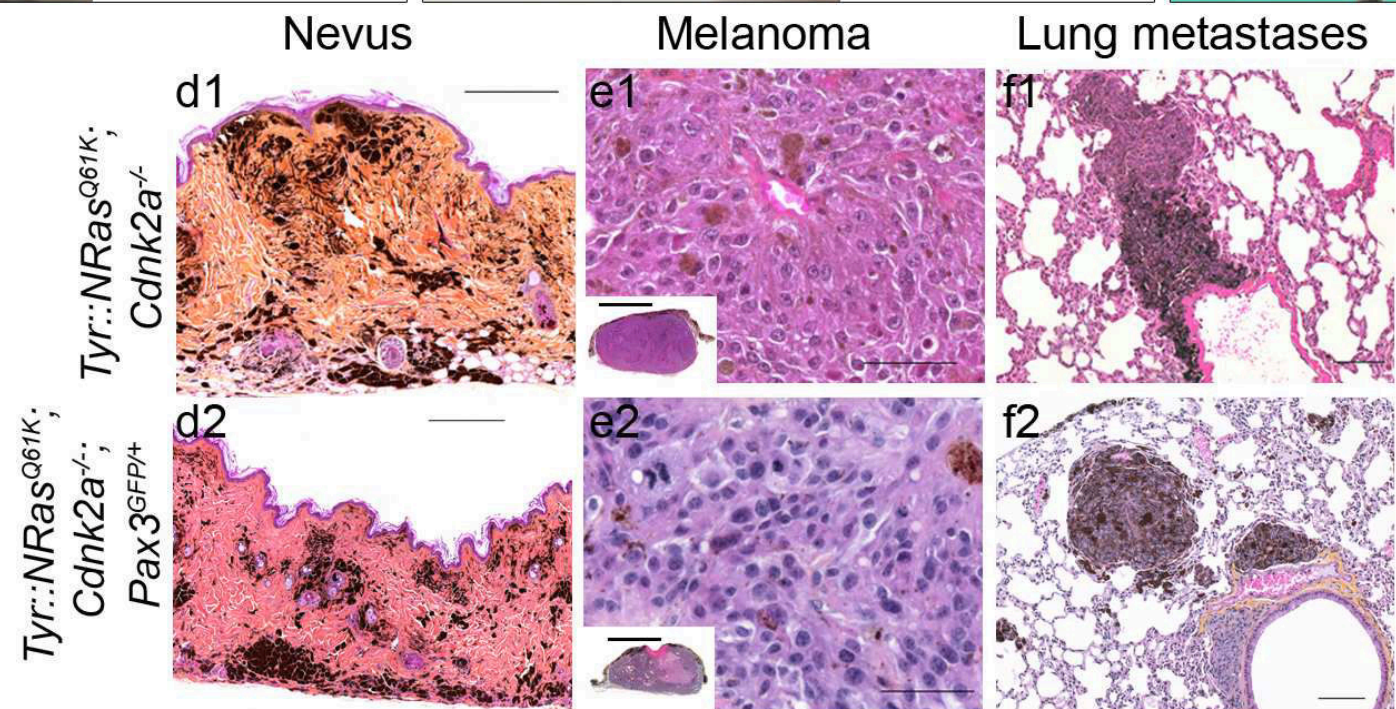
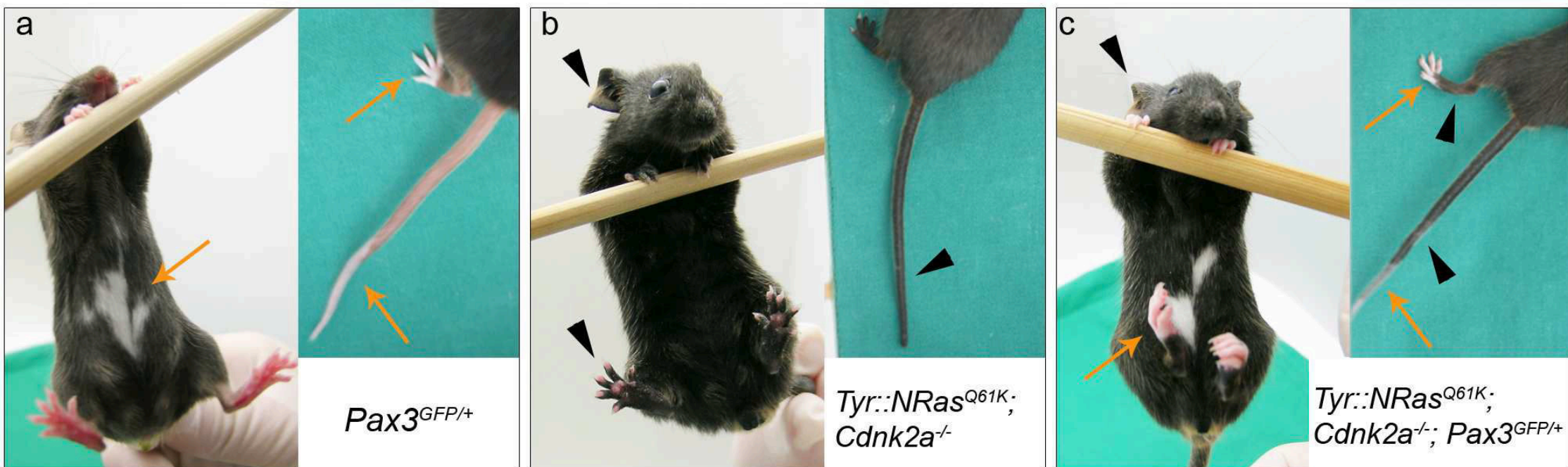
a: ApoTome microscopy analysis of GFP direct fluorescence (1, green), mostly nuclear (2) in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* melanoma sections. Bar: 10µm, **b-c:** ApoTome microscopy analysis of double labeling for PAX3 (1, green) and GFP (2, magenta) in control (b) and *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* (c) melanoma sections. Nuclear counterstaining in blue (a2, b3, c3). Corresponding bright-field photographs (a3, b5, c5). PAX3 signal is nuclear whereas GFP signal is both nuclear and cytoplasmic. Bar: 10µm.

Figure 4. FACS-sorted cells on GFP present the properties of their stage of origin

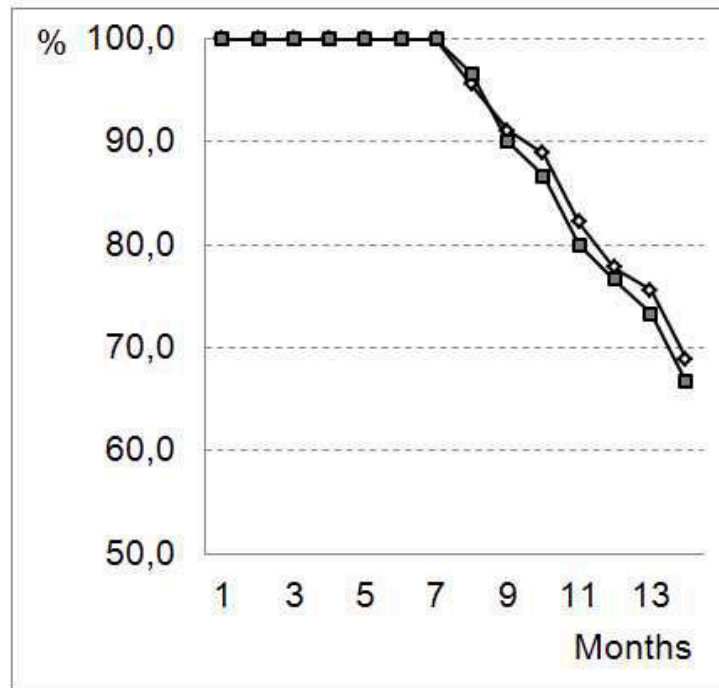
a: FACS dot plots of cells isolated from a *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* mouse primary melanoma. Primary culture of primary melanoma (PM), loco-regional metastasis (LR) and distant metastasis (DM) showing shape and pigmentation heterogeneity in FACS-sorted cells, **b:** pERK in FACS-sorted melanocytes (Mel) and during melanoma progression. **Left:** Fluorescent microscopy of pERK immunolabeling, bars: 10µm. **Right:** Western blot analysis for pERK and ERK, **c:** Photomicrographs of a soft agar assay of primary cells during melanoma progression, **d:** Photomicrographs of primary culture cells subjected to the modified Boyden chamber assay, cell quantification **e:** Fluorescent microscopy of lung metastases sections in syngeneic mice 15 days after RO injection of LR (top) or DM (bottom) primary culture cells.

Figure S1. Phospho-ERK staining in melanoma sections.

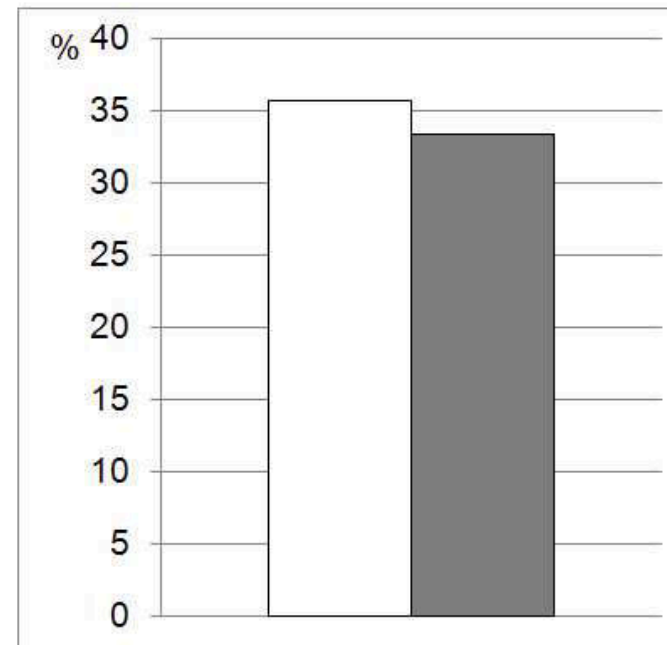
a-b: ApoTome microscopy analysis of double labeling for pERK (1, green) and PAX3 (a2, red) or GFP (b2, red) in control (a) and *Tyr::NRAS^{Q61K}; Cdkn2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* (b) melanoma sections. Nuclear counterstaining in blue (3). Corresponding bright-field photographs (5). Bar: 10µm.



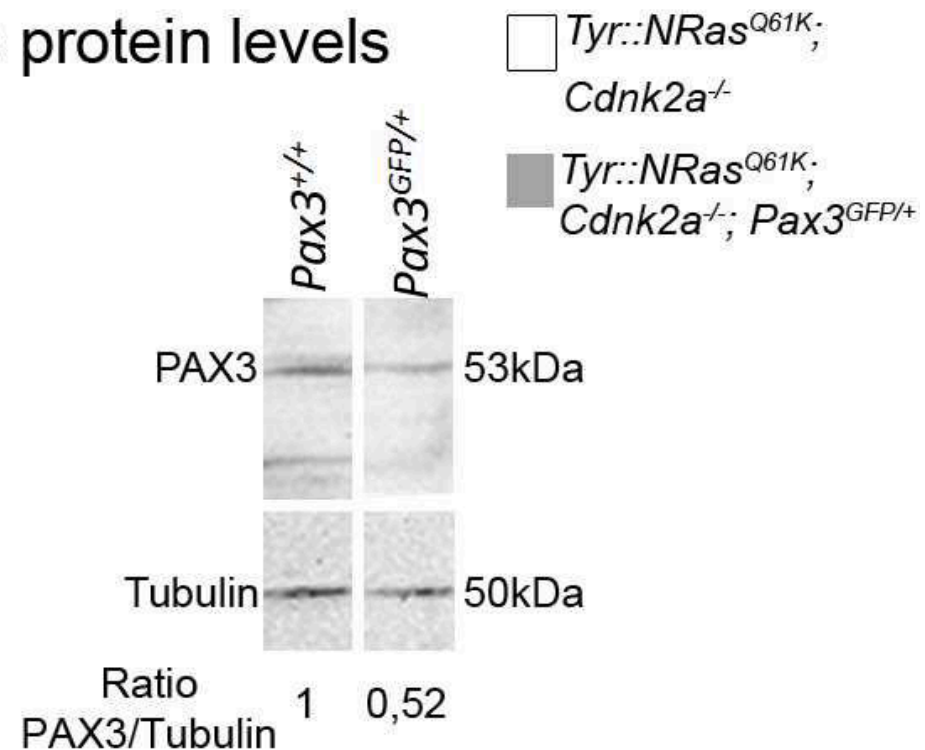
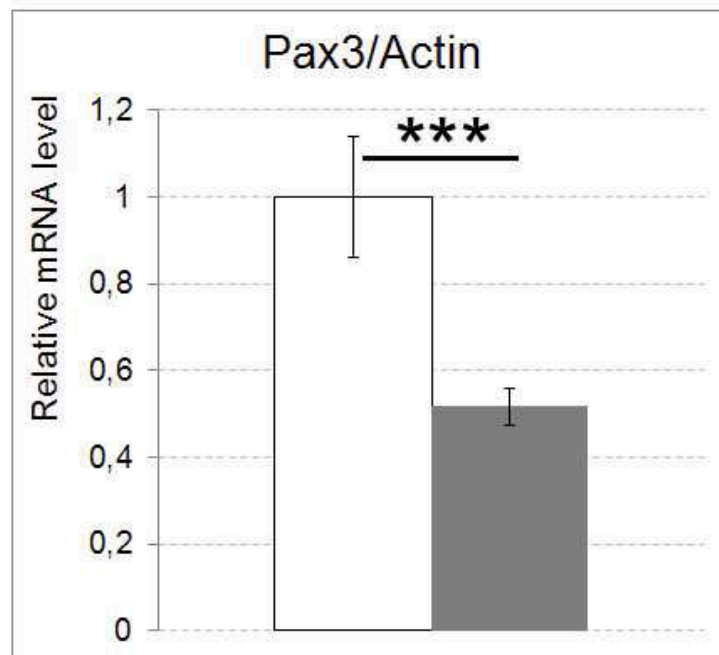
a. Survival curves



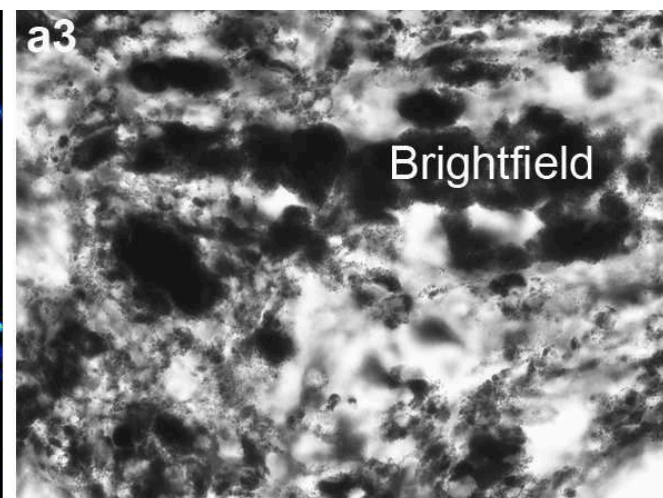
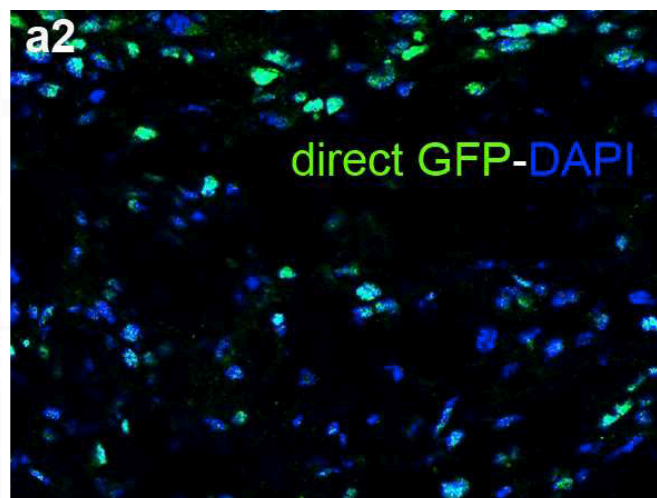
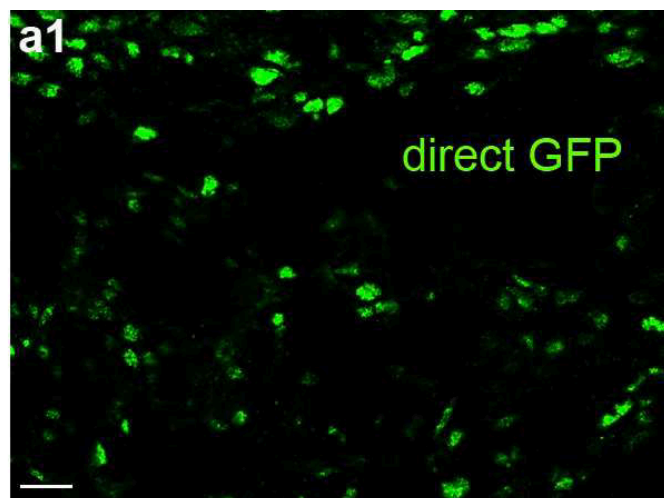
b. Lung metastases



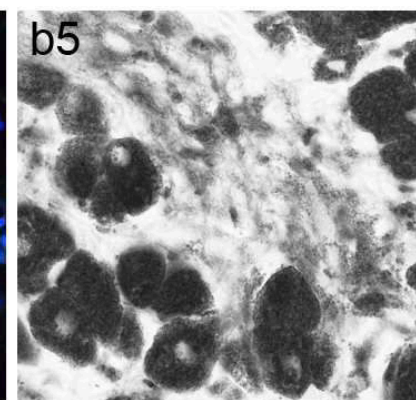
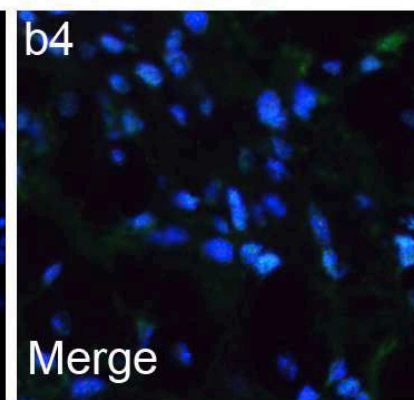
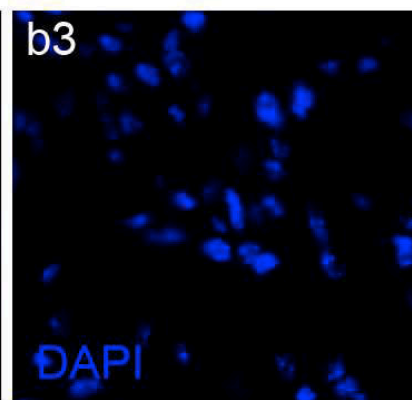
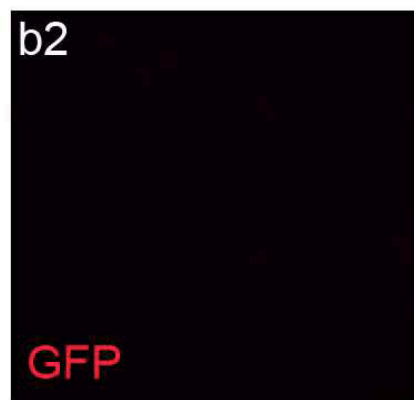
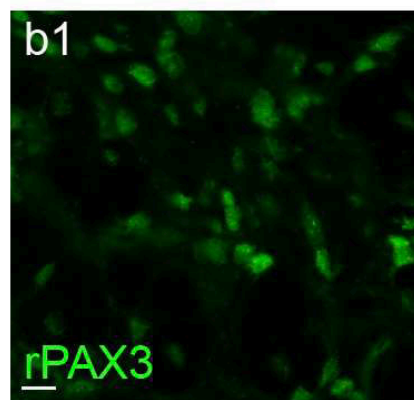
c. *Pax3* mRNA and PAX3 protein levels



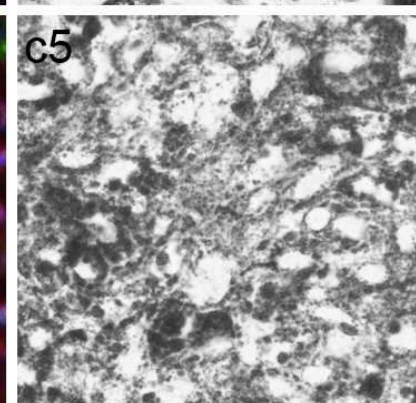
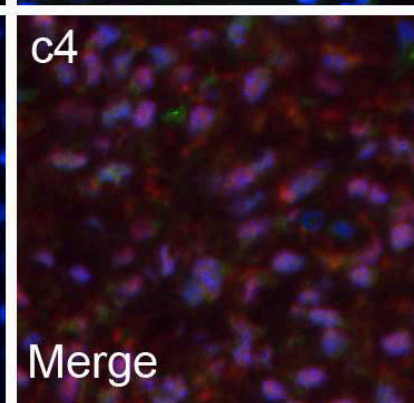
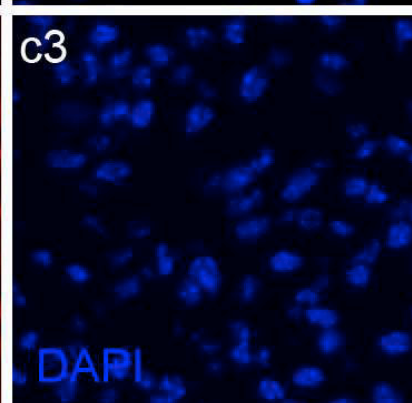
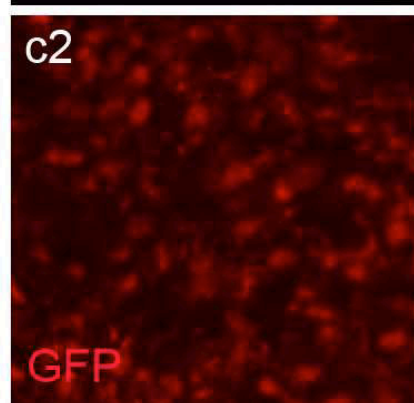
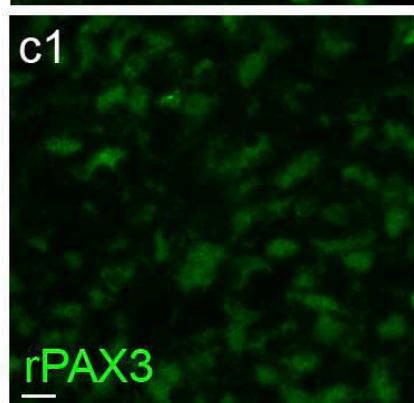
*Tyr::NRas^{Q61K},
Cdnk2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}*

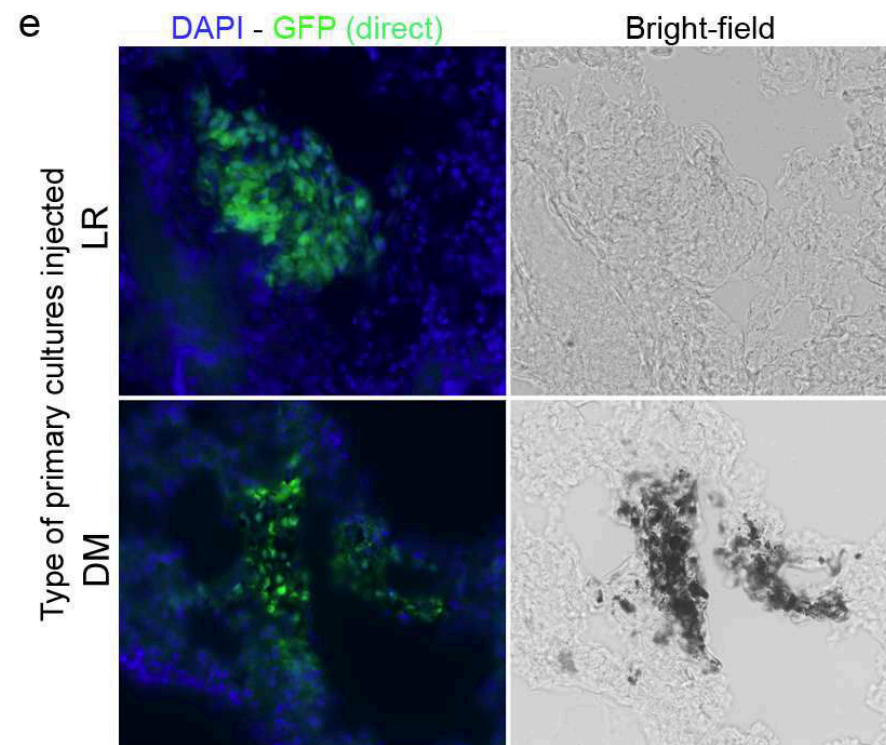
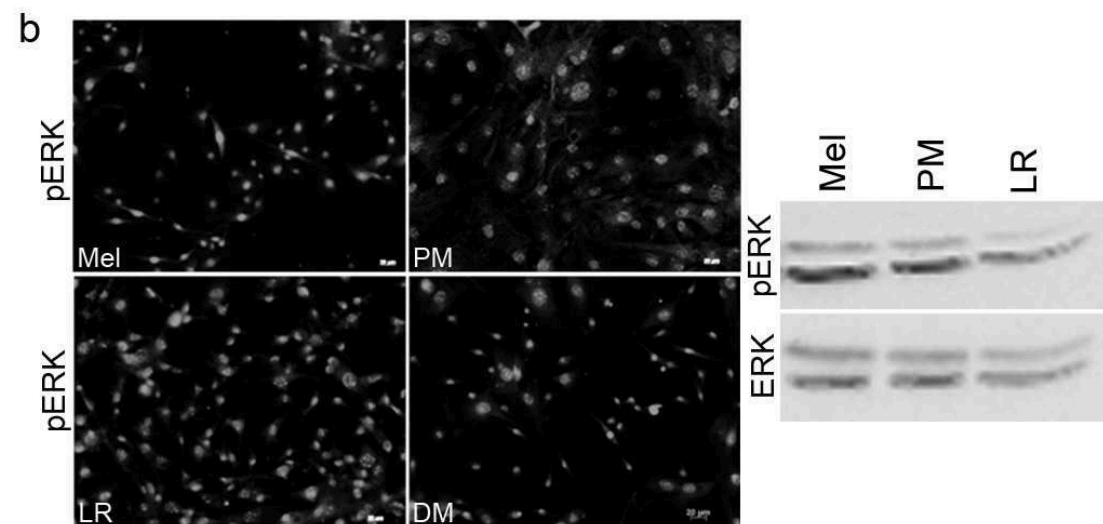
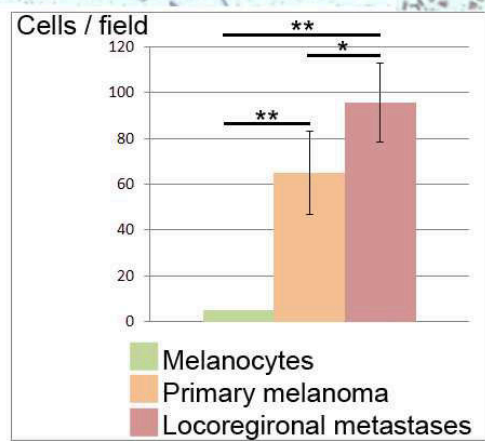
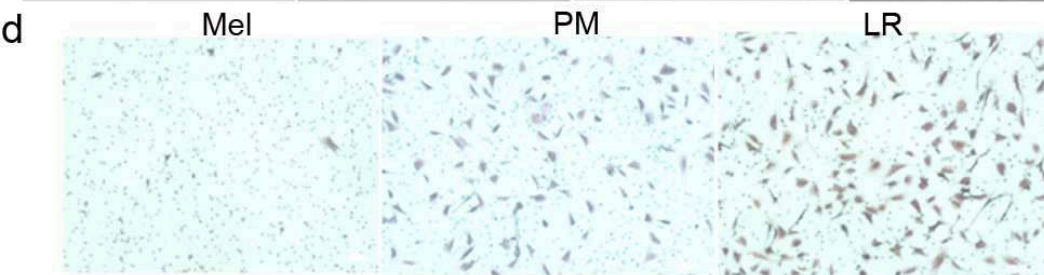
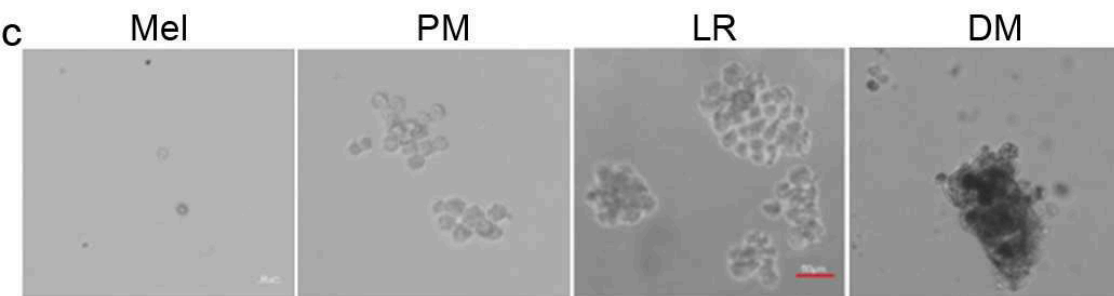
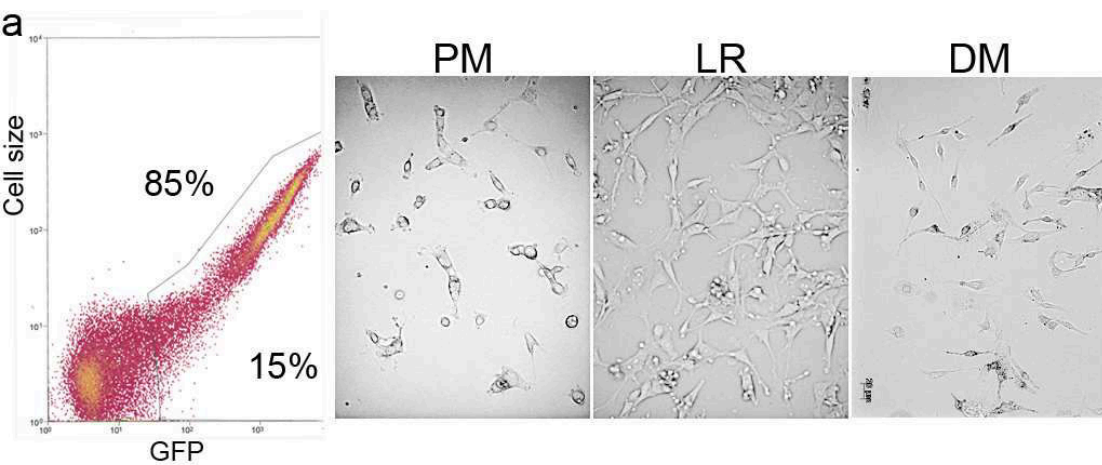


*Tyr::NRas^{Q61K},
Cdnk2a^{-/-}*

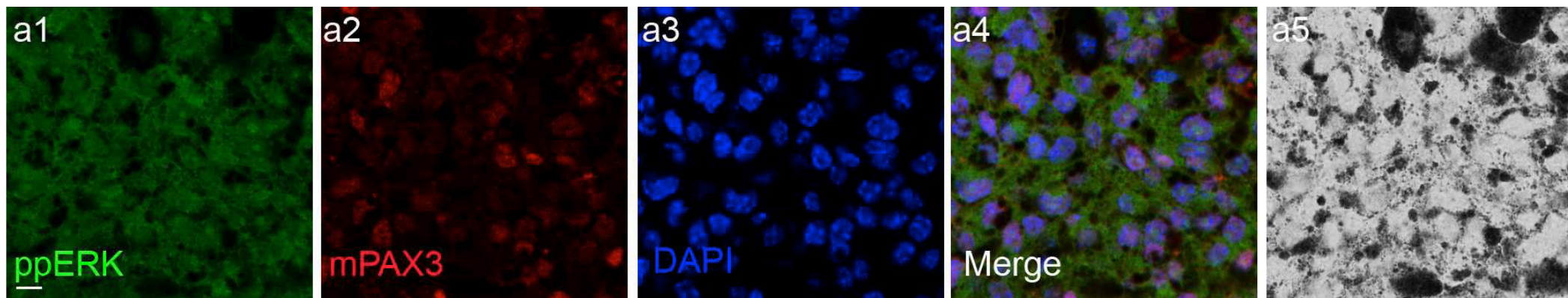


*Tyr::NRas^{Q61K},
Cdnk2a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}*

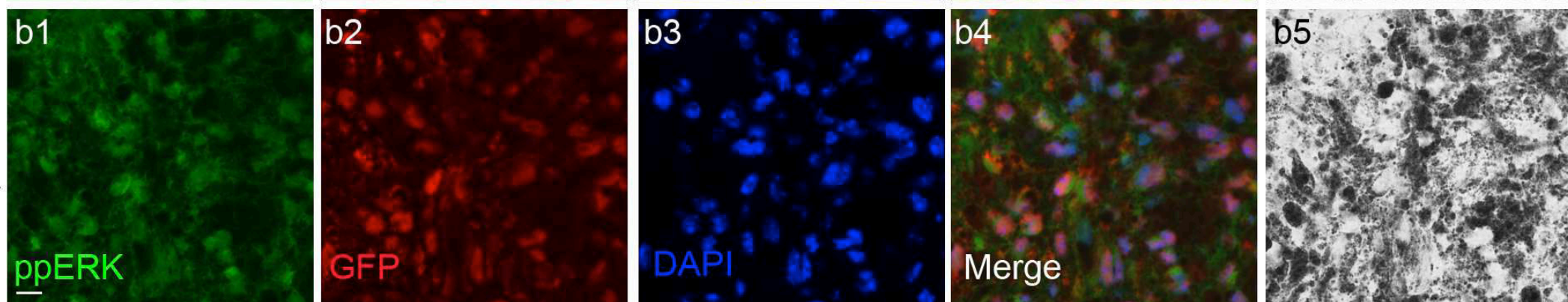




*Tyr::NRas^{Q61K},
Ink4a^{-/-}*



*Tyr::NRas^{Q61K},
Ink4a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}*



ARTICLE 4

RACK1 overexpression enhances melanoma initiation and progression *in vivo*

(En préparation)

RACK1 overexpression enhances melanoma initiation and progression *in vivo*

Campagne C^{1,2}, Reyes-Gomez E^{1,2,3}, Picco ME⁴, Julé S^{1,2,§}, Salaun P^{1,2}, Gadin S^{1,2}, Ezagal J^{1,2}, Bernex F^{1,2,3,Ψ}, Louise A⁵, Pons S⁶, Jacob Y⁸, Maskos U⁶, Lopez-Bergami P⁴, Aubin-Houzelstein G^{1,2} Panthier JJ^{1,2,9} & Egidy G^{1,2,*}.

1. INRA, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, Maisons-Alfort, F-94704 France;

2. Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale 7 avenue du Général de Gaulle, Maisons-Alfort, F-94704 France;

3. Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité d'Embryologie, d'Histologie et d'Anatomie Pathologique, 7 avenue du Général de Gaulle, Maisons-Alfort, F-94704 France;

4. Instituto de Medicina y Biología Experimental, CONICET, Buenos Aires, Argentina;

5. Plate-forme de Cytométrie, Département d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, F-75724 France;

6. Unité Neurobiologie Intégrative des Systèmes Cholinergiques, Unité de Recherche Associée 2182, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur, F75724 Paris Cedex 15, France;

7. Unité Génétique, Papillomavirus et Cancer Humain, Institut Pasteur, F75724 Paris Cedex 15, France;

8. CNRS URA 2578, Département de Biologie du Développement; USC INRA 2026, Pasteur Institute, Unité de Génétique Fonctionnelle de la Souris, 25 rue du Docteur Roux, Paris, F-75724 France;

Current adress: Memorial Sloan Kettering

§. Current adress: Laboratoire de Physiopathologie Orale et Moléculaire, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM UMRS 872, PARIS 06, France;

Ψ. Current adress: RHEM-Réseau d'histologie Expérimentale de Montpellier, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U896, Montpellier, F-34298, France;

*. Corresponding author: Dr. Giorgia EGIDY, UMR955 de Génétique Fonctionnelle et Médicale, ENVA, 7 avenue du général de Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort, France.

Tel : +33 1 43 96 70 02 Fax : +33 1 43 96 71 69

E-mail: gegidy@vet-alfort.fr

Abstract

Melanoma is the deadliest skin cancer and its incidence is rising in Caucasian population. RACK1 (Receptor for activated protein kinase C) protein was proposed as a biological marker of melanoma in human and domestic animal species harboring spontaneous melanomas. RACK1 is strongly detected and homogeneously distributed in melanoma cells of primary tumors and metastases. In sharp contrast, RACK1 is not detectable in normal skin melanocytes or in naevi. RACK1 is emerging as a potential marker of malignancy in other solid cancers. As a scaffold protein RACK1 is able to coordinate the interaction of key signaling molecules implicated in both physiological and tumorigenic cellular functions.

We tested RACK1 status in skin and melanoma of distinct melanoma models, gray horses and the *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}* transgenic mice, finding it overexpressed. We developed the first mouse model for RACK1 overexpression, *Tyr::Rack1-HA* transgenic mice, to test the effect of melanocyte-targeted RACK1 overexpression *in vivo*. In a context of melanoma predisposition, RACK1 overexpression reduced latency and increased incidence and metastatic rate. In primary mouse melanoma cells from different tumoral stages, activated JNK (c-Jun N-terminal kinase) and activated STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) acts as RACK1 oncogenic partners in tumoral progression. RACK1 knock-down in the mouse metastatic melanoma cell line B16 not only reduced invasiveness but also induced melanoma cell differentiation and loss. We propose RACK1 as a new player in melanoma development *in vivo*.

Introduction

Cutaneous melanoma is the deadliest skin cancer. Severe prognosis results from melanoma high metastatic capacity and its resistance to current therapeutic approaches. Moreover melanoma diagnosis is difficult since these neoplasms are clinically, histologically and genetically heterogeneous. Twenty percent of patients harbor metastasis at diagnosis (1). To improve prognosis, early diagnosis is essential. Biomarkers of malignancy would be helpful. RACK1 (Receptor for activated protein kinase C) protein deserves consideration as such a marker. Indeed RACK1 is strongly detected and homogeneously distributed in melanoma cells of primary tumors and metastases developed in four mammalian species: MeLiM minipigs, human patients (2), horses (3) and dogs {Campagne, 2013 #133}. This distribution pattern of RACK1 detection is specific of malignant melanocytic tumors. In sharp contrast, RACK1 is not detectable in normal skin melanocytes or in nævi{Campagne, 2013 #133;Campagne, 2012 #130;Egidy, 2008 #59}.

RACK1 was originally identified as an anchoring protein for protein kinase C (PKC) (4). RACK1 is a scaffold protein containing seven internal WD40 repeats that allow protein interactions. Through its ability to coordinate the interaction of key signaling molecules, RACK1 is thought to play a central role in critical biological responses. It is a key mediator of various pathways involved in both physiological and tumorigenic cellular function making it a signaling hub (5). *In vitro* studies on cancer cell lines reported that RACK1 could be implicated in cancer hallmarks (6). In non-small lung cancer H23 and H520 cells, rhabdomyosarcoma A673 cells, prostate cancer LnCaP cells, oral carcinoma HSC3 and Cal27 cells and breast carcinoma MCF7, MDA-MB231 and T-

47D cells, RACK1 knock-down reduced cancer cell proliferation (7-11). In ovarian carcinoma PA-1, SW626 and SKO V3 cell lines, RACK1 was shown to regulate anchorage-independent growth through the IGF1R-RACK1-STAT3 pathway (12). RACK1 was also implicated in resistance to apoptosis. RACK1 could stimulate pro-apoptotic factors degradation, Fem1b (fem-1 homolog b) in colon cancer SW620 cell line, BimEL (Bcl-2-interacting mediator of cell death extra long) in breast cancer MDA-MB-468, MCF7 and MCF7-I4 cell lines (13). Besides, RACK1 was shown to participate in formation of stress granules which inhibit apoptosis by suppressing SAPK (stress activated protein kinase) pathway (14). RACK1 was also reported as a player in angiogenesis (15). Finally, RACK1 overexpression increased migration of solid cancer cell lines (9, 10, 16) whereas RACK1 reduction suppressed metastatic invasion (17). In the pathogenesis of melanoma, comparison of transcriptomic analyses of melanocytes and melanoma cells from a minipig model revealed *RACK1* mRNA overexpression in melanoma cells (2). Another clue for a role of RACK1 came from the capacity of RACK1 to increase survival of human melanoma MeWo cells following UV induced-apoptosis. Moreover, inhibition of RACK1 expression using RNA interference was shown to reduce the tumorigenicity of MeWo cells in a xenograft tumor model (18). A role for RACK1, in the crosstalk between ERK (Extracellular signal-regulated kinase) and JNK (c-Jun N-terminal kinase) signaling in melanoma was proposed to trigger tumorigenesis (19). In the light of these *in vitro* data, we hypothesized that RACK1 overexpression, detected *in situ* in melanoma samples, is a marker of tumor progression.

As for other solid cancers, cutaneous melanoma development is considered as a multistep process. Melanomagenesis requires a combination of gain of function

mutations in oncogenes and loss of function mutations in tumor suppressor genes (20). Few years ago, a first spontaneous metastasizing melanoma model harboring *NRAS*^{Q61K} mutation in a deleted *Ink4a* background was developed (21). We investigated RACK1 status in the skin of melanoma predisposed animals as gray horses and *Tyr::NRAS*^{Q61K}; *Ink4a*^{-/-} mice. We developed *Tyr::Rack1-HA* transgenic mice and show that RACK1 overexpression, in a context of melanoma predisposition, reduced latency and increased incidence and metastatic rate. We found activated STAT3 and JNK as partners of RACK1 in melanomagenesis. Finally, RACK1 reduction by RNA interference reduced invasiveness and induced melanoma cells differentiation.

Materials and methods

Mice and genotyping. Mouse *Rack1* cDNA was tagged with HA by PCR primers before insertion in a pBSK-UPT-Tyr-sv40 plasmid. Micro-injection of the linearized vector was made in C57/CBA mice oocytes. Data come from the 7th backcross onwards on C57BL/6J background. *Pax3^{tm4Buck}* mice (referred to as *Pax3^{GFP/+}*) were produced at the Institut Pasteur (22). Transgenic *TgN[Tyr::N-RasQ61K]^{lBee}* (referred to as *Tyr::NRAS^{Q61K}*) were produced at ISREC institute (21). *Cdkn2a^{tm4Rdp}* mice (referred to as *Ink4a^{-/-}*) were produced at the Einstein College of Medicine (23). These three mouse lines have been backcrossed onto the C57BL/6J background for more than 15 generations. 8 weeks-old C57BL/6J females were used for intra-venous injection of tumoral cells. Animal care and used for this study were approved by the ethical board of Alfort Veterinary School in accordance with European Union Standards. Details and genotyping methods are in the Supplementary Material section.

Histologic analysis and immunofluorescence in mice samples. Complete necropsy and systematic pathological analysis were performed on all adult mice involved in this study as described {Campagne, 2013 #134}. Immunofluorescence was performed with mouse monoclonal anti-RACK1 (Transduction Laboratories, 1:150; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), chicken polyclonal anti-GFP (Abcam, 1: 600, Paris, France), mouse monoclonal anti-HA (Covance, 1: 600, Rueil-Malmaison, France), rabbit polyclonal anti-cytokeratin5 (Thermo scientific; 1:100; Fisher Scientific, Illkirch, France) and rabbit polyclonal anti-pERK (p42/44, 1:100, Cell Signaling, Ozyme, St Quentin, France) and rabbit polyclonal anti-ERK (Santa cruz, 1: 100, Heidelberg Germany) antibodies. Nuclear counter-staining was achieved with 4', 6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (1:1000,

Invitrogen). Sections were examined with a Zeiss Axio Observer Z1M ApoTome microscope (Carl Zeiss S.A.S.; Le Pecq, France). Controls without the first antibodies showed no unspecific labeling. Images were processed with the *AxioVision* computer program version 4.6 (Carl Zeiss). Figures are representative of the skin samples evaluated (n>8 for each line). All images shown are individual sections of z series stack. Final figures were assembled with Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems; USA).

Horse skin samples and immunofluorescence. Samples and protocol were previously described (3).

Fluorescent activated cell sorting (FACS) and cell culture. Melanocytes FACS-sorting protocol was previously described (24). Melanoma cells from primary tumors or metastases were isolated and cultured as previously described (Campagne et al in revision Pigment Cell and Melanoma Research). Melan-a melanocyte line was grown in RPMI 1640 medium and B16 melanoma cell line in DMEM medium always with supplement A. Cells were grown at 37°C under 5% CO₂ at pH 7.0-7.1. ERK inhibitor U0126 (5 and 10µM) and JNK inhibitor SP600126 (20µM) (both Sigma-Aldrich) were incubated for 24h and 48h, respectively. Human cells were cultured as previously described.

Immunofluorescence. Cells plated onto coverslips were fixed for 15 min in 2% PFA and permeabilized with ice-cold methanol for 10 min. Primary antibodies used in this study and their working dilutions are listed in Supplementary Material section.

RNA interference and transduction. *Rack1* shRNA (ID# 61854) was obtained from Ambion (Invitrogen) (26). Lentiviral vectors were produced as previously described (27).

Three *Stat3* shRNA (ID# 424803, 424802, 641819) were obtained from Open Biosystem (Thermo fisher). Details are available in supplementary section.

ARN extraction and RT-qPCR. RNA extractions were performed on 20 000 FACS-sorted cells following RNA XS kit manufacturer instructions. Experiments were carried out at least twice in triplicates. Details are available in supplementary section.

Protein extractions, immunoprecipitation and western-blot analyses. Details and primary antibodies used in this study and their working dilutions are listed in Supplementary Material section.

Soft agar Assay. Classical soft agar test was adapted for 96-well plates.

Modified Boyden chamber assay. Classical method is briefly described in supplementary Material section.

Results

RACK1 overexpression in spontaneous melanoma models.

Gray horse melanomas are an original spontaneous melanoma model. Gray horses are born colored; their hair whitens with age while the skin stays pigmented. Gray phenotype is caused by a 4.6-kb duplication in intron 6 of *STX17* (*Syntaxin-17*) (28). To identify melanocytes on tissue sections, we used an MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) antibody (3). In normal gray horse skin a cytoplasmic RACK1 signal (Fig 1A) and nuclear phospho-ERK (Fig 1B) were detected in MITF-positive CK5-negative melanocytes before any melanoma development. Neither RACK1 signal nor ERK activation were detected in non-gray horse melanocytes although total ERK signal was equivalent in gray and non gray horses skins (Fig S1).

In the *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}* mice melanoma model, transgenic *NRAS^{Q61K}* leads to melanocyte targeted ERK activation (21). To easily identify melanocytes by GFP expression, we crossed *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}* mice with *Pax3^{GFP/+}* mice. We have previously shown that introduction of *Pax3^{GFP}* allele did not impair, delay or reduce metastatic melanoma development in the *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}* mouse model (Campagne *et al.*, submitted). In *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* prior to any melanocytic lesion, normal skin sections, displayed a specific cytoplasmic RACK1 signal in GFP-positive, CK5-negative melanocytes (Fig 1B). Both follicular and interfollicular melanocytes displayed this specific RACK1 signal (Fig S2). The overexpression of RACK1 was confirmed by the observation of higher *Rack1* mRNA levels in

Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}; Pax3^{GFP/+} FACS-sorted melanocytes compared to *Ink4a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* controls (Fig 1C).

Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}; Pax3^{GFP/+} mice develop multiple melanocytic lesions of variable clinical and histopathological severity {Campagne, 2013 #134}. RACK1 was immunodetected in all lesions from *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* as well as in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}* (not shown). Taking advantage of the *Pax3^{GFP}* allele to sort cells on GFP we established primary cultures for different stages of melanoma progression: primary tumor (PT), locoregional metastasis (LM), distant metastasis (DM) which, as expected, presented a phosphor-ERK signal in all cells according to *NRAS^{Q61K}* expression (Campagne *et al.*, submitted). In PT, LM and DM cells, overexpression of *Rack1* mRNA and high RACK1 protein level were identified (Fig). Western-blot analysis revealed a marked increased of RACK1 60kDa band in tumor cells compared to melanocytes (Fig 1D).

Thus, in different melanoma models, RACK1 overexpression together with ERK activation is associated to melanoma predisposition. Additional modifications are thought to be required to initiate melanoma development.

Development of a new melanoma model based on RACK1-HA expression.

To address a causative role of RACK1 on melanoma development, we generated *Tyr::Rack1-HA* transgenic mice. We used the 6.1kb promoter sequence of the mouse *Tyrosinase* gene in combination with the 3.6kb distal control region (30) to target the expression of the murine *Gnb2l1* gene (called *Rack1* thereafter), that encodes RACK1, tagged by hemagglutinin (HA) to the melanocytic lineage (Fig 2A). RACK1-HA

expression from the *Tyr::Rack1-HA* transgene was detected *in vitro* (Fig 2A). Five *Tyr::Rack1-HA* transgenic founders were obtained using classical transgenesis. All founders were viable, fertile and reached adulthood without displaying any overt phenotype (Fig 2A). Three lines were established with offspring from three distinct founders and analyzed in details. In order to easily identify melanocytes on sections and be able to FACS-sort melanocytes the three lines were crossed with *Pax3^{GFP/+}* mice. Melanocytes were FACS-sorted on GFP from back skins of 3 days-old pups for the three transgenic lines and RT-qPCR were performed. As expected, *Rack1* mRNA levels in melanocytes were higher in *Tyr::Rack1-HA; Pax3^{GFP/+}* mice than in *Pax3^{GFP/+}* littermates in each transgenic line (Fig 2B). Protein expression of RACK1 in melanocytes in furry and glabrous skin was assessed by immunofluorescence for the three transgenic lines (Fig 2C, Fig S3). In control *Pax3^{GFP/+}* melanocytes, RACK1 protein was highly expressed in the cytoplasm of keratinocytes considered positive controls. In contrast, melanocytes identified as GFP-positive cells were negative for RACK1. We excluded the possibility that melanocytes displayed membrane RACK1 signal with triple immunostaining against RACK1, GFP and cytokeratin 5 (CK5), a marker of basal keratinocytes (Fig 2C, first line). In *Tyr::Rack1-HA; Pax3^{GFP/+}* melanocytes, GFP and HA protein signals were colocalized (Fig 2C, third line). Moreover, a specific cytoplasmic RACK1 signal was detected in GFP and HA-positive melanocytes (third line). Triple immunostaining against RACK1, GFP and CK5 confirmed the melanocytic origin of the RACK1 signal (second line). Thus, in our three *Tyr::Rack1-HA* transgenic mouse lines, *Rack1* mRNA was overexpressed and RACK1 protein was detected in melanocytes. This excluded a positional consequence of the transgene insertion.

RACK1 was reported to associate with the core kinases of the ERK pathway, Raf, MEK, and ERK. RACK1 reduction resulted in a lower ERK activity while RACK1 overexpression produced an increased ERK activation (31, 32). We tested ERK activation in melanocytes of both transgenic *Tyr::Rack1-HA; Pax3^{GFP/+}* and *Pax3^{GFP/+}* control mice by immunostaining (Fig 2D). In control *Pax3^{GFP/+}* melanocytes, phospho-ERK signal was hardly detected. On the other side, in *Tyr::Rack1-HA; Pax3^{GFP/+}* melanocytes, nuclear GFP and phospho-ERK signals were colocalized. Besides, phospho-ERK signal was also identified in keratinocytes nuclei. Noteworthy, total ERK expression was equivalent in both sample types (Fig S4). This result suggests that RACK1 overexpression was associated with ERK activation.

Over the 17 months of follow-up, no melanocytic lesion was detected in any of the three transgenic lines and skin histological structure was normal (Fig S5) suggesting that RACK1 overexpression alone was not sufficient to drive melanoma development.

By breeding, we produced *Tyr::Rack1-HA; Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{+/-}; Pax3^{GFP/+}* mice for the three *Tyr::Rack1-HA* independent transgenic lines. These mice developed melanocytic lesions ranging from benign to malignant tumors (Campagne, Reyes-Gomez *et al.*, in preparation). No significant difference in latency and incidence was seen between the three independent transgenic lines. No histological difference was detected comparing these lesions to those of control *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{+/-}; Pax3^{GFP/+}* littermates (Fig 3A). Nevertheless, the *Tyr::Rack1-HA; Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{+/-}; Pax3^{GFP/+}* mice in each line showed reduced latency (Mann-Whitney test; $p < 0,002$) and increased incidence (X^2 test; $p < 0,05$) of melanoma development (Fig 3B). Moreover, distant metastases were more frequently identified in *Tyr::Rack1-HA; Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{+/-}; Pax3^{GFP/+}* mice.

Ink4a^{+/-}; *Pax3*^{GFP/+} mice compared to control mice (Fig 3C). These results provide the first evidence of an oncogenic role of RACK1 in melanoma development *in vivo*.

STAT3 and JNK as oncogenic partners of RACK1 in melanoma development.

To identify pathways mediating RACK1 effect on melanomagenesis, we looked at the activation of PKCαβ_{II}, STAT3 and JNK in *Tyr::NRAS*^{Q61K}; *Ink4a*^{-/-}; *Pax3*^{GFP/+} mice. These proteins were selected because they were both previously identified as potential partners of RACK1 protein (interactome data, Api2net: <http://bioinfow.dep.usal.es/apid/apid2net.html>) and were implicated in melanoma development (20, 33). Phosphorylation of PKCαβ_{II} was detected both in melanocytes and in tumoral cells, independently of their progression stage. On the other hand, phospho-STAT3 and phospho-JNK were just observed in LM and DM cells (Fig 4A).

As STAT3 and JNK proteins were found activated in the LM cells which are representative of the first metastatic stage, we analyzed them with further detail. To confirm direct RACK1 and STAT3 functional interaction, we first validated RACK1 and STAT3 physical interaction using a luciferase complementation assay in mammalian cells (HT-GPCA: High-Throughput *Gaussia princeps* Protein Complementation Assay). As a positive control for RACK1 interaction we use phosphodiesterase 4D (PDE4D) with a score of 22.3. The ratio cutoff for non-interacting protein pairs was set at 3.5 (34). STAT3 showed a strong interaction with RACK1 with a score of 71.9. (Fig 4B, Table S1). We also validated the expression of STAT3 in our cells by Western blot as well as its binding to RACK1, after RACK1 immunoprecipitation (Fig 4B). Interestingly,

STAT3 knock-down in LM cells by RNA interference through lentiviral transduction led to *Rack1* mRNA and RACK1 protein reduction (Fig 4C). *STAT3* knock-down effect on RACK1 protein levels was also effective in human melanoma cell lines Lu1205, WM9 and UACC903 (Fig 4D).

To study the link between JNK and RACK1 we showed direct interaction between phospho-JNK and RACK1 in our cells by Western blot analysis after RACK1 immunoprecipitation (Fig 4E). Moreover, inhibition of JNK by the compound SP600125 reduced the levels of both 36kDa and 60kDa forms of RACK1 in LM cells (Fig 4E). In agreement with above findings, phospho-STAT3 was slightly reduced in treated cells (Fig 4E). Inhibition of JNK activation did also reduced STAT3 activation in human melanoma cell lines (Fig 4F). We also compared FACS-sorted cells derived from primary melanomas of *Tyr::Rack1-HA*; *Tyr::NRAS^{Q61K}*; *Ink4a^{+/-}*; *Pax3^{GFP/+}* mice with the ones from *Tyr::NRAS^{Q61K}*; *Ink4a^{+/-}*; *Pax3^{GFP/+}* mice. In soft agar assay, cells overexpressing *Rack1* started forming clones earlier than control cells (Fig 4G). In addition, we observed pJNK immunoreactivity in *Tyr::Rack1-HA* melanoma cells not only in the nucleus but also in the cytosol (Fig 4H).

Thus, we propose STAT3 and JNK as oncogenic partners of RACK1 protein in melanoma development.

RACK1 knock-down reduced highly metastatic melanoma cells invasiveness and led to cell differentiation.

To confirm the involvement of RACK1 in melanoma development and progression we sought to develop a syngenic xenograft model of RACK1 silencing. To this end we developed a RACK1 shRNA virus by inserting a previously validated

sequence (26) in a backbone allowing visual control of infection (27) (Fig 5A). Three days post transduction of metastatic B16 cells (Fig S6), RACK1 protein was efficiently reduced as evaluated by immunofluorescence and Western blot analyses (Fig 5A). We confirmed the specific effect of our shRNA in the melan-a mouse melanocyte line (Fig S7).

We assessed the effect of RACK1 silencing on anchorage-independent cell growth. Soft agar assays revealed that only 40% of B16-sh*Rack1* cells formed clones in soft agar compared to 86 and 88% in B16-sh*Scramble* and B16-mock cells, respectively (X^2 test; $p < 0.0005$) (Fig 6B). Furthermore, the B16-sh*Rack1* clones formed were smaller than the B16-sh*Scramble* and B16-mock clones (Fig 5C). This reduced size of B16-sh*Rack1* clones was in part due to a proliferation arrest shown by a sharp reduction of Ki67 staining (Fig 5D). Confirming above results, RACK1 knock-down led to phospho-STAT3 reduction (Fig 5D).

However, B16-sh*Rack1* cells were progressively lost from day 10 to day 20 post transduction, being replaced by cells not expressing the shRNA (Fig 5E). This prevented us from using these transduced cells for xenograft experiments *in vivo*. During this period, the remaining B16-sh*Rack1* cells showed a more differentiated phenotype. They switched from the typical rounded B16 shape to a melanocyte-like shape with dendritic extensions (Fig 5E).

Discussion

We showed RACK1 overexpression in two distinct melanoma models – genetically engineered *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}* mice and gray horses. We identified RACK1 overexpression in melanocytes prior to any neoplasm. Another feature of both models is ERK activation in healthy skin, despite the underlying mechanism of ERK activation in these models is different. No mutation was found in *NRAS* gene in gray horse melanomas (Golovko A, unpublished data). Interestingly, MAPK pathway activity was reported to require elevated levels of RACK1; indeed the expression of an N-truncated RACK1 inhibited *Ras*-mediated phosphorylation of ERK in NIH3T3 cells (35).

RACK1 overexpression was described in several solid cancers. Its detection *in situ* was proposed as a diagnostic marker in melanoma (2), hepatocarcinoma (36), oral squamous carcinoma (37), breast cancer (38) and non-small cell lung carcinoma (10) among others. Yet, no clue on RACK1 function *in vivo* was provided.

In this study, we developed the first *in vivo* model for RACK1 overexpression targeted to melanocytes. Our results support the model of RACK1 as a major player in melanomagenesis. We generated *Tyr::Rack1-HA* transgenic mice to test RACK1 role in melanoma initiation and progression *in vivo*. We showed that transgenic *Tyr::Rack1-HA* mice overexpressed *Rack1* in melanocytes that associated with phospho-ERK detection. Nevertheless, *Tyr::Rack1-HA* mice did not developed melanoma suggesting that additional alterations are required. *Tyr::NRAS^{Q61K}* transgenic mice, that harbor both ERK activation and RACK1 overexpression in melanocytes, develop spontaneous melanoma with low incidence (21). In this model, *NRAS^{Q61K}* triggers MAPK and PI3K/AKT

pathways activation (20). Breeding *Tyr::Rack1-HA* mice with *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}* mice enhanced melanoma initiation and progression with reduced latency and increased incidence and distant metastases. We provided a first evidence of a role for RACK1 in melanomagenesis *in vivo*.

RACK1 serves as a signaling hub that has been implicated in regulation of several pathways. To identify proteins mediating RACK1 role in melanomagenesis, we looked at the activation status of PKC $\alpha\beta_{II}$, STAT3 and JNK in primary cultures. Based on the *Pax3^{GFP}* allele, we proposed a reliable way to FACS-sort pure primary culture of melanoma cells. In addition to the time-saving, we reduced the loss of tumor cells heterogeneity occurring through culture selection of melanoma cells in total cell suspensions. Moreover, we proved *in vitro* and *in vivo* that our sorted cells kept the invasive properties of the melanoma progression stage considered.

Phospho- PKC $\alpha\beta_{II}$ was detected since early melanoma stages as previously described (2). Instead STAT3 and JNK proteins were found activated in the LM cells which are representative of the first metastatic stage. Clinically, severe prognosis results from the metastases; improved therapy will benefit from molecular understanding of this stage. Phospho-STAT3 was mainly found in locoregional metastatic cells which is consistent with progressive activation found in human A375P and A375Br melanoma cell lines (39) and in tumor samples (40). In melanoma cells, activated STAT3 was reported to sustain expression of the anti-apoptotic genes, *Bcl-xL* (*B-cell lymphoma-extra large*) and *Mcl-1* (*Myeloid cell leukemia sequence 1*) (41). STAT3 activation could upregulate MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) expression (42). STAT3 activation might be a crucial event in metastasis development. Confirming the functional interaction between

STAT3 and RACK1 we found that RACK1 was regulated at the mRNA level by STAT3. Furthermore, we identified STAT3 as a direct RACK1 partner in melanoma development. Noteworthy, activated STAT3 mediated maintenance of NF- κ B activity in a human A2058 melanoma cell line (43) and NF- κ B upregulates the transcription of RACK1 through direct interaction with its promoter and contributes to cell survival in PC12 cells (44). Interestingly, we found a strong binding of RACK1 to NF- κ B by the luciferase complementation assay.

In our primary culture cells, JNK activation marked progression to loco-regional metastases. Fittingly, JNK expression and phosphorylation increased in metastatic 1205Lu melanoma cells as compared with the primary cell (45). In superficial spreading melanoma samples, activation of JNK was associated with poor prognosis (46). However, oncogenic role of JNK/c-Jun pathway in melanoma development is still under debate (47). The tumor suppressor *p16^{INK4a}* was reported to exert its inhibitory role on tumor cells by suppressing JNK activity (48). In our system, *Ink4a* deletion was not sufficient alone to trigger JNK activation. Lopez-Bergami *et al.* described that RACK1 mediates JNK activation by PKC *in vitro* (18). Moreover, in human A375, Lu1205, WM9 and WM115 melanoma cell lines, constitutively active ERK can provide signals to increase the activity of JNK via a rewired signaling (19). In the primary melanoma cells from *Tyr::Rack1-HA; Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{+/-}; Pax3^{GFP/+}* mice, phospho-JNK was detected both in the nucleus and cytoplasm of cells. JNK activity was increased has seen in the kinase assay. Although we have not explored the underlying mechanism of JNK activation, our *ex vivo* data support a previous *in vitro* model where its activation as been driven by PKC, ERK and RACK1 and are consistent with the observation of a positive

correlation between cytoplasmic phospho-JNK and phospho-ERK in human melanoma samples (46) where RACK1 is overexpressed (2). Besides, inhibition of JNK activity led to decreased activation of STAT3. This was recently reported in colon cancer cells after treatment with AS601245, another JNK inhibitor (49). It is in agreement with the previous demonstration of STAT3 activation via the JNK pathway to promote cancer cells resistance to doxorubicin treatment (50).

B16 mouse melanoma cells harbor both STAT3 activation and JNK activation (data not shown). RACK1 silencing in B16 cell line led to reduced invasive capacities and cell differentiation and loss. The differentiated shape with dendritic extensions closely resembles *in situ* status of melanocytes in normal skin where no RACK1 is detected (2, 3). Nevertheless, the wide implication of RACK1 in physiological processes bans the possibility to directly act on this protein. Identification of RACK1-protein interactions holds the opportunity to develop new therapeutics by the design of peptides interfering with specific binding partners of RACK1 (5).

In summary, we demonstrated that RACK1 is implicated in melanomagenesis. RACK1 enhanced melanoma initiation and progression *in vivo*. We proposed activated STAT3 and JNK as RACK1 partners in the metastatic process. Specific interference between RACK1 and its partners must be further analyzed as a potential therapeutic improvement in melanoma treatment.

Acknowledgements

We wish to thank A. Casanova, C. Koenen and P. Wiart for dedicated animal husbandry. Paired-box transcription factor 3 IgG2a developed by C.P. Ordahl and Small Ubiquitin-like Modifier-2/3 developed by M.J. Matunis were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, set up under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. We are grateful to A. Champeix and P. Wattier for sample inclusions in paraffin. We thank S. Bibi for technical help with qPCR, and A. Eychene for helpful discussions. We are thankful to A. Golovko for horses skins, to Z. Ronaï for control plasmid used in preliminary experiments. This work was supported by grants from Institut National de la Recherche Agronomique, Agence Nationale de la Recherche Emergence Bio, Ecos-Sud and Association pour la Recherche contre le Cancer. CC received a grant (Allocation de Recherche MENRT) from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (2009-2012). PME received a grant from the CONICET.

Figure legends

Figure 1. RACK1 overexpression in melanocytes from gray horse and in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* mice melanoma models.

A, Skin from non-gray and gray horses. ApoTome microscopy analysis of triple labeling for MITF (red), RACK1 (green) and CK5 (magenta) in non-gray and gray horse skins. Arrowheads point to melanocytes overexpressing RACK1. Second set: ApoTome microscopy analysis of double labeling for MITF (red) and phospho-ERK (green) in non-gray and gray horse skins. Arrows point to phospho-ERK signal in melanocytes. Nuclear counterstaining in blue. Bars: 10µm.

B, Dorsal skin from *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* and control *Ink4a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* mice. ApoTome microscopy analysis of triple labeling for GFP (red), RACK1 (green) and CK5 (magenta). Arrows point to melanocytes overexpressing RACK1. Arrowheads point to melanocytes without RACK1 detection. Nuclear counterstaining in blue. Bars: 10µm.

C, Reverse transcription-qPCR for RACK1 in melanocytes isolated from *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* mice compared to control (n=10).

D, *Rack1* mRNA and RACK1 protein level in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* cells from each stages of melanoma progression. Western-blot analysis for RACK1. Note a 60kDa band specific to tumoral cells.

Figure 2. RACK1 overexpression in melanocytes is not sufficient to predispose for melanoma.

A, Scheme of the *Tyr::Rack1-HA* construct, genotyping strategy (orange arrows) and phenotype of the transgenic mice. The transgene was detected by PCR. Western-blot analysis for HA after RACK1 immunoprecipitation.

B, Reverse transcription-qPCR for RACK1 in melanocytes isolated by FACS on GFP from the three transgenic *Tyr::Rack1-HA Pax3^{GFP/+}* lines compared to littermates.

C, ApoTome microscopy analysis of triple labeling for GFP (red), RACK1 (green) and CK5 (magenta) or GFP (red), HA (cyan) and RACK1 (green) in control *Pax3^{GFP/+}* mice and in *Tyr::Rack1-HA; Pax3^{GFP/+}* littermates in transgenic line 1. Arrows point to melanocytes overexpressing RACK1.

D, ApoTome microscopy analysis of double labeling for GFP (red) and phospho-ERK (green) in control and in *Tyr::Rack1-HA; Pax3^{GFP/+}* mice in transgenic line 1. Arrowheads point to melanocytes overexpressing pERK. Nuclear counterstaining in blue. Bars: 10µm.

Figure 3. RACK1 overexpression reduced latency and increased incidence of melanoma development in a *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}* mice.

A, Histological features (haematoxylin-eosin-saffron staining) of melanocytic nevi, primary cutaneous melanoma and lung metastases in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{+/-}; Pax3^{GFP/+}* mice and *Tyr::Rack1-HA; Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{+/-}; Pax3^{GFP/+}* mice. Note that lesions are histologically indistinguishable among groups.

B, Kaplan-Meier survival curves for melanoma in *Tyr::Rack1-HA; Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{+/-}; Pax3^{GFP/+}* mice (n=22) compared to *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{+/-}; Pax3^{GFP/+}* control mice (n=25). Mice from the three transgenic lines were pooled in the Kaplan-Meier graph.

C, Lung metastases incidence in percentage in *Tyr::Rack1-HA; Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{+/-}; Pax3^{GFP/+}* mice compared to control.

Figure 4. STAT3 and JNK as oncogenic partners of RACK1 in melanoma development.

A, Fluorescent microscopy analysis of immunolabeling for phospho-PKCαβ_{II}, phospho-STAT3 and phospho-JNK in *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}; Pax3^{GFP/+}* cells from each stage of melanoma progression. Bars: 10µm.

B, Luciferase complementation assay identified direct physical interaction between RACK1 and STAT3. Western-blot analysis for phospho-STAT3 confirmed the increased expression of STAT3 in metastases cells than in primary melanoma cells, and shows direct biological interaction between RACK1 and STAT3 after RACK1 immunoprecipitation in LM cells.

C, *Rack1* mRNA (RT-qPCR) and RACK1 protein (Western-blot) levels after STAT3 knock-down in LM cells.

D, *RACK1* mRNA (RT-qPCR) and RACK1 protein (Western-blot) levels after *STAT3* knock-down in human melanoma cell lines.

E, Western-blot analysis for phospho-JNK protein after RACK1 immunoprecipitation in melanoma and locoregional metastases cells. Western-blot analysis for RACK1 protein after SP600126 treatment (15μM, 48h) in locoregional metastases cells.

F, Western blot analysis for phospho-STAT3 and STAT3 proteins after SP600126 treatment of human melanoma cell lines with and without stimulation with Wnt5A.

G, Soft agar assay, day 6, comparing *Tyr::Rack1-HA; Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{+/-}; Pax3^{GFP/+}* primary melanoma cells to *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{+/-}; Pax3^{GFP/+}* control cells. Bar: 50μm.

H, Fluorescent microscopy analysis of immunolabeling for phospho-JNK (red) in *Tyr::Rack1-HA; Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{+/-}; Pax3^{GFP/+}* primary melanoma cells. Nuclear counterstaining in DAPI (blue). Bars: 10 μm.

Figure 5. RACK1 knock-down reduced B16 melanoma cells invasiveness and led to cell differentiation.

A, Lung metastasis after IV injection of B16 melanoma cells in syngeneic mice.

B, Lentiviral vector backbone for RACK1 shRNA expression. Fluorescent microscopy analysis of direct GFP signal in transduced cells. Fluorescent microscopy analysis of immunolabeling for RACK1 (red). Nuclear counterstaining in blue. Bars: 10 μm. Western-blot analysis for RACK1 in B16-sh*Rack1* and B16-shScramble cells.

C, Soft agar assay of B16-sh*Rack1* and B16-shScramble. Proportion of clones and lone cells in percentage.

D, Soft agar assay of B16-sh*Rack1*, B16-shScramble and mocked cells. Fluorescent microscopy analysis of immunolabeling for GFP (green) and RACK1 (red).

E, Fluorescent microscopy analysis of immunolabeling for Ki67 (red). Fluorescent microscopy analysis of immunolabeling for phospho-STAT3 (red). Nuclear counterstaining in DAPI (blue). Bars: 10 μm.

F, Aspect of B16-sh*Rack1* and B16-shScramble cultures 14 days after transduction. Note the differentiation and loss of GFP-positive transduced cells in B16-sh*Rack1* culture.

References

^a Cécile Campagne, Sophia Julé, Florence Bernex, Mercedes Estrada, Geneviève Aubin-Houzelstein, Jean-Jacques Panthier & Giorgia Egidy. *Canine melanoma diagnosis: RACK1 as a new biological marker.*

^b Campagne C, Reyes-Gomez E, Julé S, Bernex F, Beermann F, Panthier JJ, Aubin-Houzelstein G & Egidy G. *Tyr::NRas^{Q61K}; Ink4a^{-/-}; Pax3^{GFP/+} mice develop metastasizing melanoma and allow melanoma cells identification on GFP.*

1. Ross MI. Sentinel node biopsy for melanoma: an update after two decades of experience. *Semin Cutan Med Surg.* 2010;29:238-48.
2. Egidy G, Jule S, Bosse P, Bernex F, Geffrotin C, Vincent-Naulleau S, et al. Transcription analysis in the MeLiM swine model identifies RACK1 as a potential marker of malignancy for human melanocytic proliferation. *Mol Cancer.* 2008;7:34.
3. Campagne C, Jule S, Bernex F, Estrada M, Aubin-Houzelstein G, Panthier JJ, et al. RACK1, a clue to the diagnosis of cutaneous melanomas in horses. *BMC veterinary research.* 2012;8:95.
4. Ron D, Chen CH, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:839-43.
5. Adams DR, Ron D, Kiely PA. RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell communication and signaling : CCS.* 2011;9:22.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74.
7. Cao XX, Xu JD, Xu JW, Liu XL, Cheng YY, Wang WJ, et al. RACK1 promotes breast carcinoma proliferation and invasion/metastasis in vitro and in vivo. *Breast cancer research and treatment.* 2010;123:375-86.
8. Kraus S, Gioeli D, Vomastek T, Gordon V, Weber MJ. Receptor for activated C kinase 1 (RACK1) and Src regulate the tyrosine phosphorylation and function of the androgen receptor. *Cancer research.* 2006;66:11047-54.
9. Li J, Guo Y, Feng X, Wang Z, Wang Y, Deng P, et al. Receptor for activated C kinase 1 (RACK1): a regulator for migration and invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 2012;138:563-71.
10. Shi S, Deng YZ, Zhao JS, Ji XD, Shi J, Feng YX, et al. RACK1 promotes non-small-cell lung cancer tumorigenicity through activating sonic hedgehog signaling pathway. *The Journal of biological chemistry.* 2012;287:7845-58.
11. Wang F, Osawa T, Tsuchida R, Yuasa Y, Shibuya M. Downregulation of receptor for activated C-kinase 1 (RACK1) suppresses tumor growth by inhibiting tumor cell proliferation and tumor-associated angiogenesis. *Cancer science.* 2011;102:2007-13.
12. Zhang W, Zong CS, Hermanto U, Lopez-Bergami P, Ronai Z, Wang LH. RACK1 recruits STAT3 specifically to insulin and insulin-like growth factor 1 receptors for activation, which is important for regulating anchorage-independent growth. *Molecular and cellular biology.* 2006;26:413-24.

13. Subauste MC, Ventura-Holman T, Du L, Subauste JS, Chan SL, Yu VC, et al. RACK1 downregulates levels of the pro-apoptotic protein Fem1b in apoptosis-resistant colon cancer cells. *Cancer biology & therapy*. 2009;8:2297-305.
14. Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nature cell biology*. 2008;10:1324-32.
15. Berns H, Humar R, Hengeler B, Kiefer FN, Battegay EJ. RACK1 is up-regulated in angiogenesis and human carcinomas. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14:2549-58.
16. Kiely PA, O'Gorman D, Luong K, Ron D, O'Connor R. Insulin-like growth factor I controls a mutually exclusive association of RACK1 with protein phosphatase 2A and beta1 integrin to promote cell migration. *Molecular and cellular biology*. 2006;26:4041-51.
17. Li G, Ji XD, Gao H, Zhao JS, Xu JF, Sun ZJ, et al. EphB3 suppresses non-small-cell lung cancer metastasis via a PP2A/RACK1/Akt signalling complex. *Nature communications*. 2012;3:667.
18. Lopez-Bergami P, Habelhah H, Bhounik A, Zhang W, Wang LH, Ronai Z. RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C [corrected]. *Mol Cell*. 2005;19:309-20.
19. Lopez-Bergami P, Huang C, Goydos JS, Yip D, Bar-Eli M, Herlyn M, et al. Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma. *Cancer cell*. 2007;11:447-60.
20. Bennett DC. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment cell & melanoma research*. 2008;21:27-38.
21. Ackermann J, Fruttschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer research*. 2005;65:4005-11.
22. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*. 2005;435:948-53.
23. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*. 1996;85:27-37.
24. Djian-Zaouche J, Campagne C, Reyes-Gomez E, Gadin-Czerw S, Bernex F, Louise A, et al. Pax3(GFP) ,a new reporter for the melanocyte lineage, highlights novel aspects of PAX3 expression in the skin. *Pigment cell & melanoma research*. 2012.
25. Jule S, Bosse P, Egidy G, Panthier JJ. Establishment and characterization of a normal melanocyte cell line derived from pig skin. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*. 2003;16:407-10.
26. Mourtada-Maarabouni M, Kirkham L, Farzaneh F, Williams GT. Functional expression cloning reveals a central role for the receptor for activated protein kinase C 1 (RACK1) in T cell apoptosis. *Journal of leukocyte biology*. 2005;78:503-14.
27. Avale ME, Faure P, Pons S, Robledo P, Deltheil T, David DJ, et al. Interplay of beta2* nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:15991-6.

28. Rosengren Pielberg G, Golovko A, Sundstrom E, Curik I, Lennartsson J, Seltenhammer MH, et al. A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nat Genet.* 2008;40:1004-9.
29. Sviderskaya EV, Hill SP, Evans-Whipp TJ, Chin L, Orlow SJ, Easty DJ, et al. p16(Ink4a) in melanocyte senescence and differentiation. *Journal of the National Cancer Institute.* 2002;94:446-54.
30. Camacho-Hubner A, Beermann F. Increased transgene expression by the mouse tyrosinase enhancer is restricted to neural crest-derived pigment cells. *Genesis (New York, NY : 2000).* 2001;29:180-7.
31. Vomastek T, Iwanicki MP, Schaeffer HJ, Tarcsafalvi A, Parsons JT, Weber MJ. RACK1 targets the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway to link integrin engagement with focal adhesion disassembly and cell motility. *Molecular and cellular biology.* 2007;27:8296-305.
32. O'Donovan HC, Kiely PA, O'Connor R. Effects of RACK1 on cell migration and IGF-I signalling in cardiomyocytes are not dependent on an association with the IGF-IR. *Cell Signal.* 2007;19:2588-95.
33. Lopez-Bergami P, Fitchman B, Ronai Z. Understanding signaling cascades in melanoma. *Photochemistry and photobiology.* 2008;84:289-306.
34. Cassonnet P, Rolloy C, Neveu G, Vidalain PO, Chantier T, Pellet J, et al. Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. *Nature methods.* 2011;8:990-2.
35. Bjorndal B, Myklebust LM, Rosendal KR, Myromslien FD, Lorens JB, Nolan G, et al. RACK1 regulates Ki-Ras-mediated signaling and morphological transformation of NIH 3T3 cells. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2007;120:961-9.
36. Bourd-Boittin K, Le Pabic H, Bonnier D, L'Helgoualc'h A, Theret N. RACK1, a new ADAM12 interacting protein. Contribution to liver fibrogenesis. *The Journal of biological chemistry.* 2008;283:26000-9.
37. Wang Z, Zhang B, Jiang L, Zeng X, Chen Y, Feng X, et al. RACK1, an excellent predictor for poor clinical outcome in oral squamous carcinoma, similar to Ki67. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990).* 2009;45:490-6.
38. Cao XX, Xu JD, Liu XL, Xu JW, Wang WJ, Li QQ, et al. RACK1: A superior independent predictor for poor clinical outcome in breast cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2010;127:1172-9.
39. Xie TX, Huang FJ, Aldape KD, Kang SH, Liu M, Gershenwald JE, et al. Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis. *Cancer research.* 2006;66:3188-96.
40. Messina JL, Yu H, Riker AI, Munster PN, Jove RL, Daud AI. Activated stat-3 in melanoma. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center.* 2008;15:196-201.
41. Niu G, Bowman T, Huang M, Shivers S, Reintgen D, Daud A, et al. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene.* 2002;21:7001-10.

42. Xie TX, Wei D, Liu M, Gao AC, Ali-Osman F, Sawaya R, et al. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene*. 2004;23:3550-60.
43. Lee H, Herrmann A, Deng JH, Kujawski M, Niu G, Li Z, et al. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer cell*. 2009;15:283-93.
44. Choi DS, Young H, McMahon T, Wang D, Messing RO. The mouse RACK1 gene is regulated by nuclear factor-kappa B and contributes to cell survival. *Molecular pharmacology*. 2003;64:1541-8.
45. Han MJ, Wang H, Beer LA, Tang HY, Herlyn M, Speicher DW. A systems biology analysis of metastatic melanoma using in-depth three-dimensional protein profiling. *Proteomics*. 2010;10:4450-62.
46. Jorgensen K, Davidson B, Florenes VA. Activation of c-jun N-terminal kinase is associated with cell proliferation and shorter relapse-free period in superficial spreading malignant melanoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2006;19:1446-55.
47. Lopez-Bergami P. The role of mitogen- and stress-activated protein kinase pathways in melanoma. *Pigment cell & melanoma research*. 2011;24:902-21.
48. Choi BY, Choi HS, Ko K, Cho YY, Zhu F, Kang BS, et al. The tumor suppressor p16(INK4a) prevents cell transformation through inhibition of c-Jun phosphorylation and AP-1 activity. *Nature structural & molecular biology*. 2005;12:699-707.
49. Cerbone A, Toaldo C, Pizzimenti S, Pettazzoni P, Dianzani C, Minelli R, et al. AS601245, an Anti-Inflammatory JNK Inhibitor, and Clofibrate Have a Synergistic Effect in Inducing Cell Responses and in Affecting the Gene Expression Profile in CaCo-2 Colon Cancer Cells. *PPAR research*. 2012;2012:269751.
50. Kim JH, Lee SC, Ro J, Kang HS, Kim HS, Yoon S. Jnk signaling pathway-mediated regulation of Stat3 activation is linked to the development of doxorubicin resistance in cancer cell lines. *Biochemical pharmacology*. 2010;79:373-80.

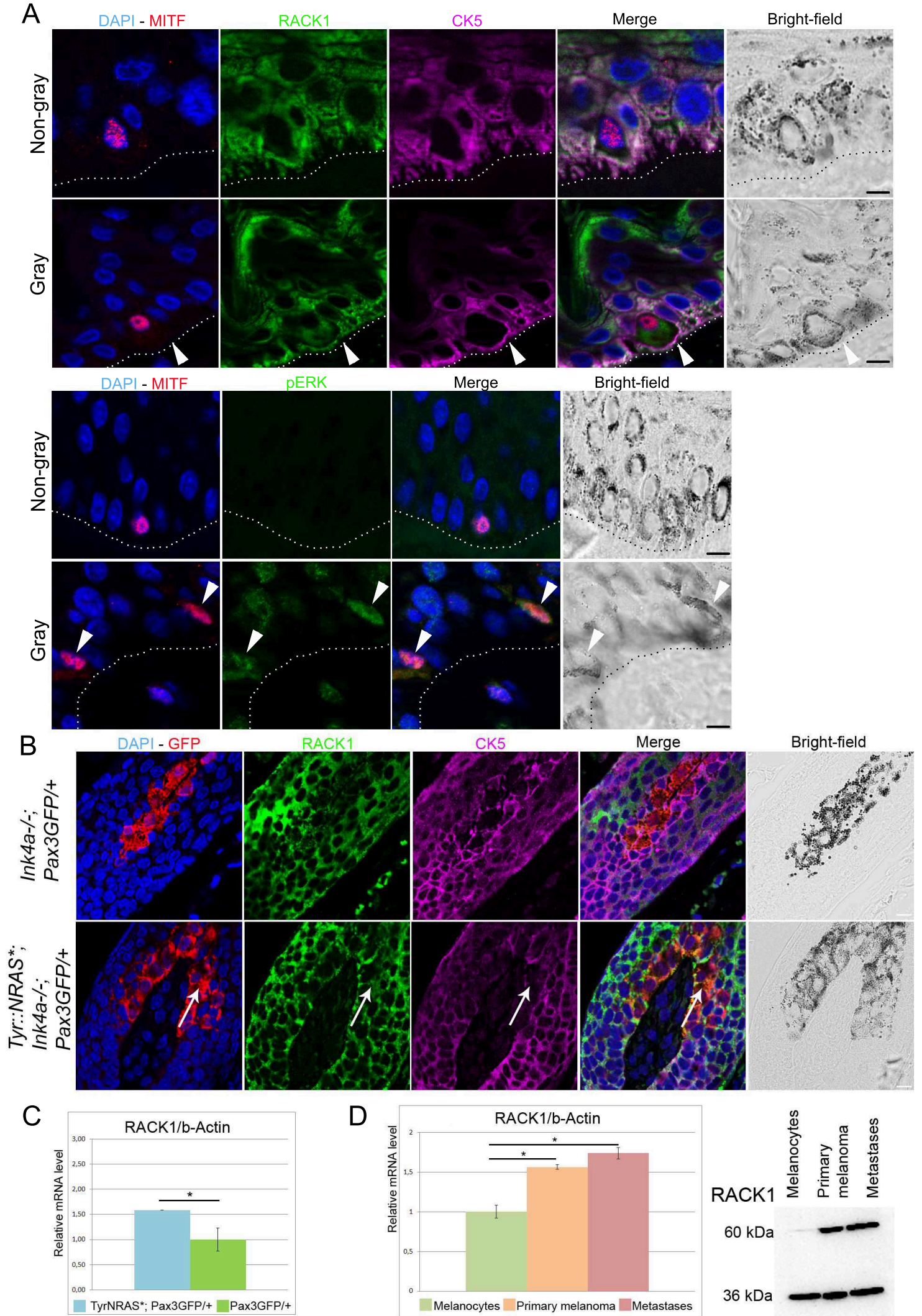


Figure 1.

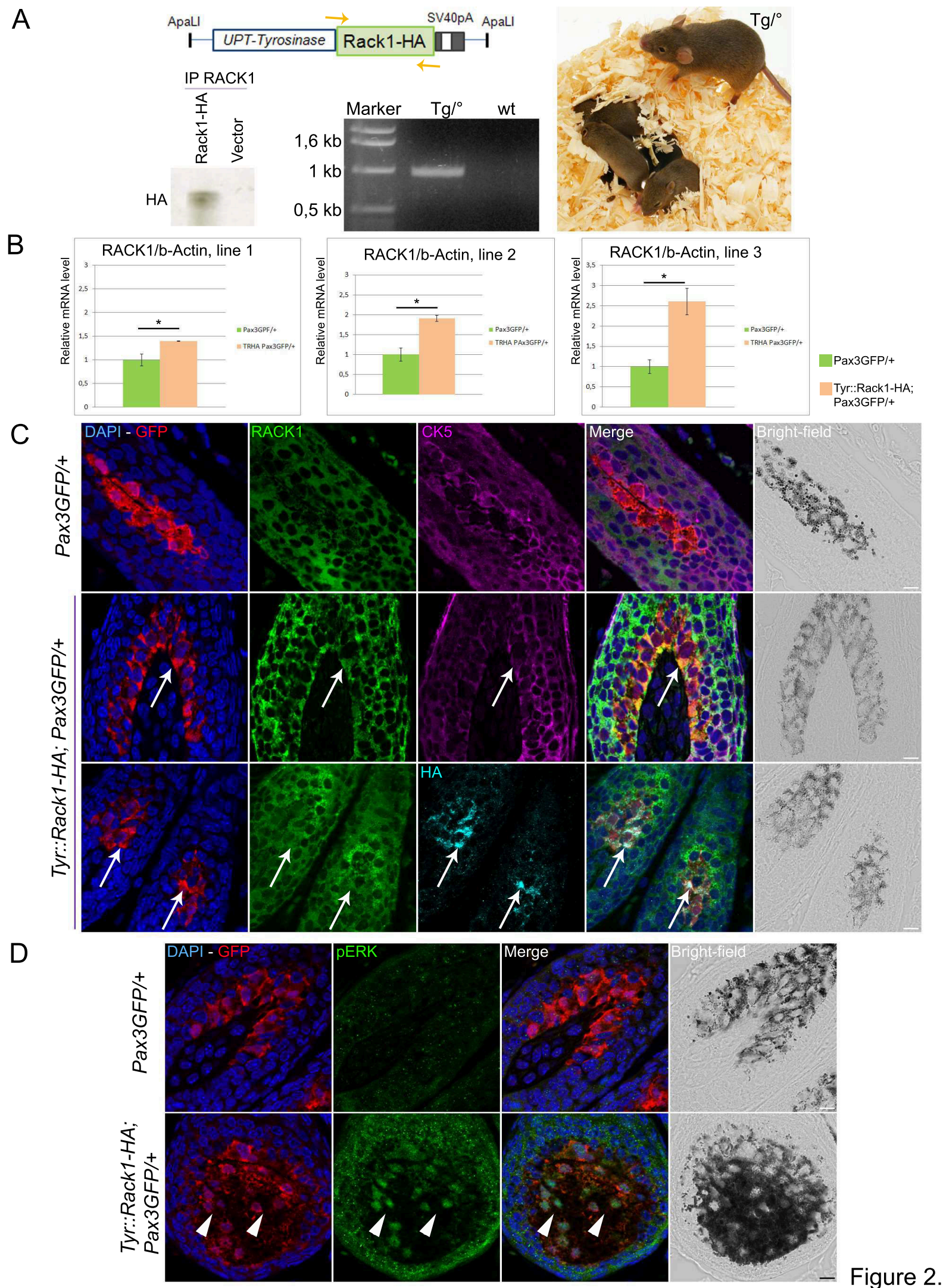
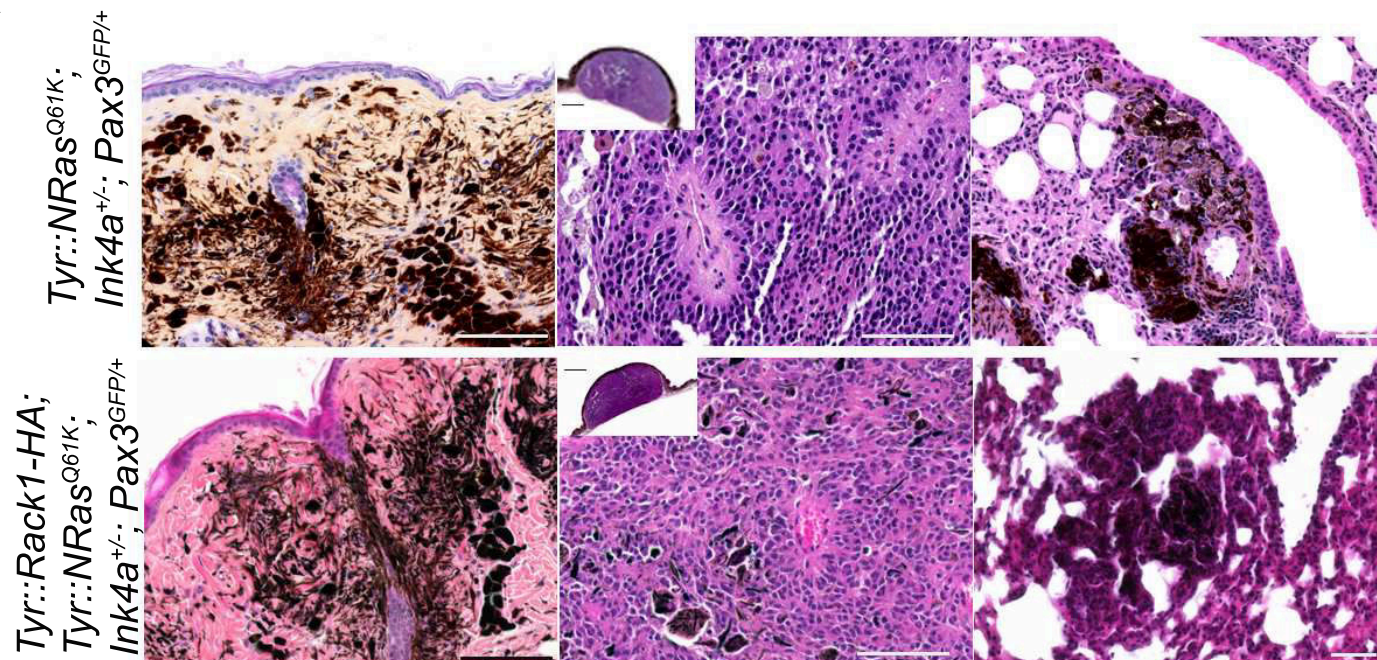
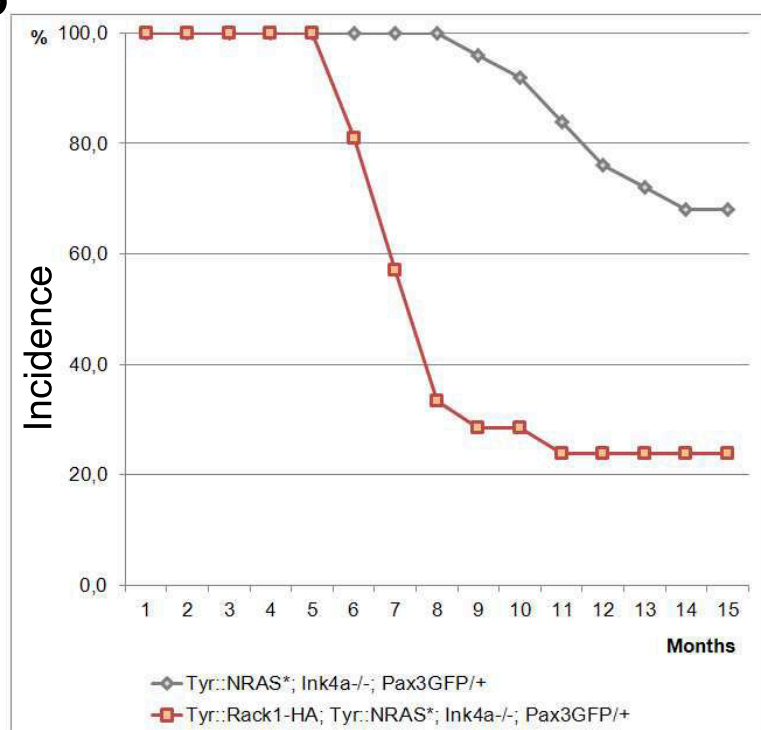


Figure 2.

A



B



C

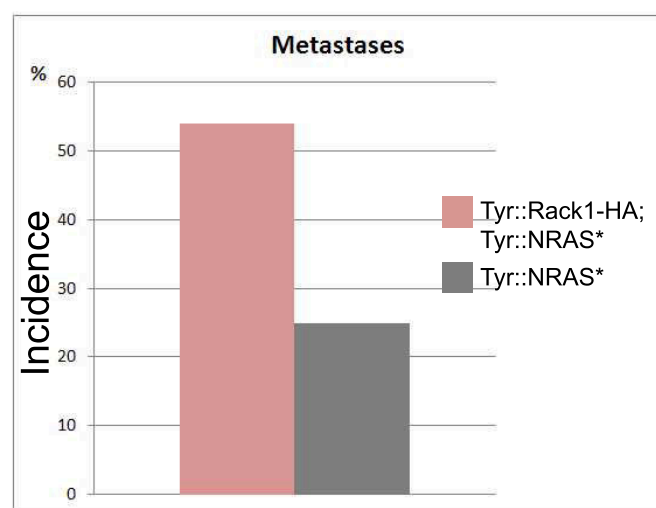


Figure 3

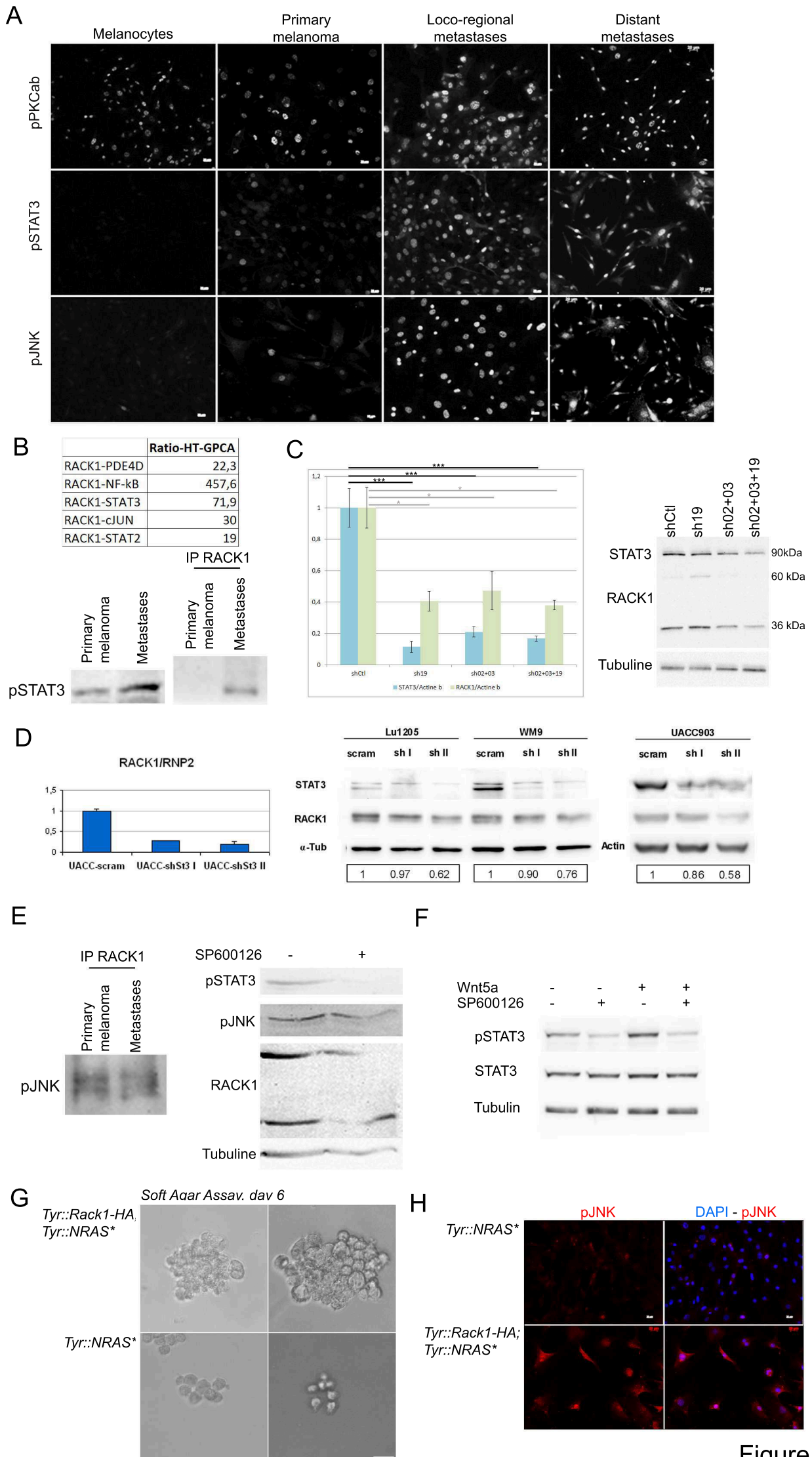


Figure 4.

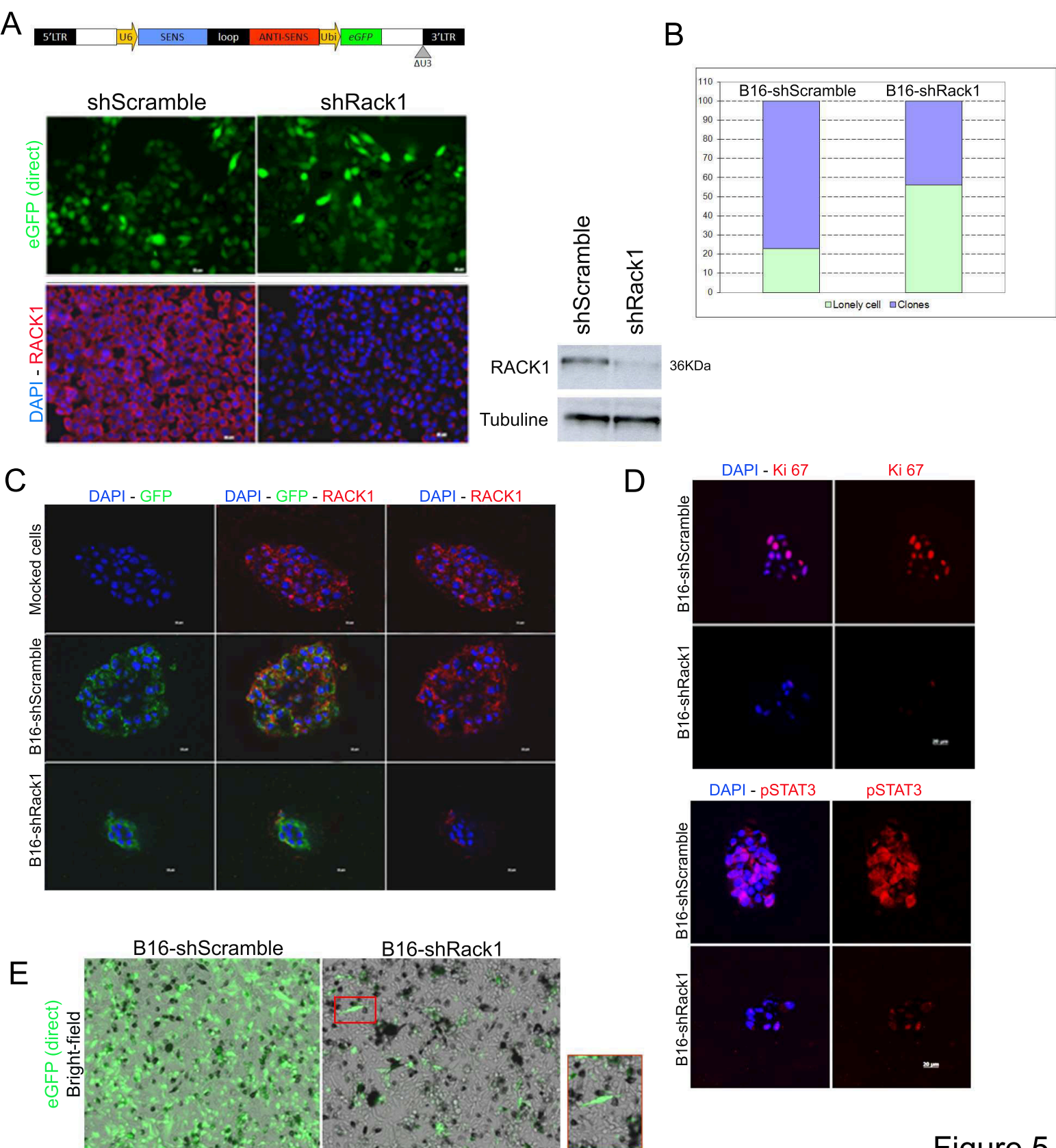


Figure 5.

III - CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DE LA LIGNEE *Tg(DCT::SBNO2)*

A - Introduction

Les souris patchwork ont un phénotype de pelage unique chez la souris. La juxtaposition de poils blancs et noirs, sans aucun poil gris, est en effet à notre connaissance le seul véritable phénotype rouan chez la souris.

L'intervalle génétique dans lequel a été cartographié le locus *patchwork* est de petite taille mais très riche en gènes. En effet, sa taille est de 1,47 Mb mais le nombre de gènes inclus dans l'intervalle est de 85. Parmi ces gènes, plus de 20 sont connus pour être exprimés dans le lignage mélanocytaire. Nous nous sommes intéressés au gène *Sbno2* car il semblait un bon candidat par sa fonction et se trouvait surexprimé dans la peau embryonnaire à E17,5, au moment où patchwork est indispensable à la survie des mélanoblastes. Mais nous n'avons pas pu mettre en évidence de changement nucléotidique ou de réarrangement dans le gène *Sbno2*. La mutation patchwork pourrait affecter un élément de régulation de *Sbno2*, éventuellement situé à grande distance de la séquence codante, et provoquant la surexpression de *Sbno2* dans le lignage mélanocytaire. Le seul moyen de tester cette hypothèse était de voir si la surexpression de *Sbno2* dans le lignage mélanocytaire suffisait à reproduire le phénotype unique des souris patchwork.

Dans ce but, nous avons produit des souris transgéniques exprimant l'ADNc de *Sbno2* sous le contrôle d'un promoteur minimal *Dct*. Parmi les 7 lignées de souris produites qui surexprimaient *Sbno2*, une seule a présenté un phénotype de couleur du pelage. Dans l'article en préparation suivant (article 5), nous montrons que les souris *Tg(Dct::Sbno2)* de cette lignée présentent bien le même phénotype de couleur du pelage que les mutants patchwork. Cependant, elles ont des phénotypes additionnels inattendus : elles présentent un blanchiment précoce du pelage, une hyperactivité progressive et des lésions des nerfs périphériques.

B - Résultats – Matériels et Méthodes

Les pages suivantes correspondent aux Résultats et aux Matériels & Méthodes d'un article en préparation sur le phénotype des souris *Tg(Dct::Sbno2)*.

ARTICLE 5

Overexpression of transcription factor *Strawberry Notch homolog 2* in cells derived from the neural crest is associated with roan coat colour, premature hair greying and spontaneous locomotor hyperactivity in mice

(En préparation)

ARTICLE EN PREPARATION

Overexpression of transcription factor *Strawberry Notch homolog 2* in cells derived from the neural crest is associated with roan coat colour, premature hair greying and spontaneous locomotor hyperactivity in mice

Reyes-Gomez E.^{1,2,3}, da Silva N.^{1,2}, Gadin-Czerw S.^{1,2}, Guillaud L.^{1,2}, Blondelle J.^{1,2}, Panthier J. J.⁴
and Aubin-Houzelstein G.^{1,2}

1 : INRA, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

2 : Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale, Maisons-Alfort, France

3 Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité d'Embryologie, d'Histologie et d'Anatomie Pathologique, Maisons-Alfort, France

4 CNRS URA 2578, Département de Biologie du Développement; USC INRA 2026, Pasteur Institute, Unité de Génétique Fonctionnelle de la Souris, Paris, France

CORRESPONDENCE Geneviève Aubin-Houzelstein, e-mail: ghouzelstein@free.fr

RESULTS

Expression of *Sbno2* in the skin

To test whether *Sbno2* was expressed in melanoblasts and melanocytes in vitro, we used reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) analysis for *Sbno2* expression in cell cultures. *Sbno2* was expressed in wild-type melanoblasts and melanocytes of established lines (Figure S1). We then tested whether *Sbno2* was also expressed in melanocytes ex vivo. Cells from the skin of *Pax3*^{GFP/+} pups at P3 were enriched in melanocytes based on GFP expression as previously described (Djian-Zaouche et al., 2012), their RNA extracted and *Sbno2* expression was assessed by RT-PCR in both melanocyte-enriched population at P3. Expression of *Sbno2* could be detected in the melanocyte-enriched cell population (Figure S1).

To study the expression pattern of *Sbno2* in the skin, we produced mice carrying a gene-trap allele of *Sbno2* (*Sbno2*^{Gt(pGT2Lxf)1Alf}, referred to as *Sbno2*^{Gt1}). The gene-trap vector *pGT2Lxf* in the *Sbno2*^{Gt1} allele contained the β-galactosidase (β-gal) reporter gene, allowing us to get insights into *Sbno2* expression pattern. During embryogenesis of *Sbno2*^{Gt1/+} mice, the reporter gene started being expressed in the skin at E14.5. From E15.5 to birth, it was expressed in the entire skin (Figure S1). Its expression pattern was wider than what was observed in the skin of embryos carrying *Tg(Dct::lacZ)*, a reporter for the melanocyte lineage. It suggested that *Sbno2* is expressed in at least one other cell type than melanoblasts in the skin (Figure S1). To test this hypothesis, RNAs were extracted from the skin of *Kit*^{W-lacZ/+} and *Kit*^{W-lacZ/Kit}^{W-lacZ} fetuses at E17.5. *Kit*^{W-lacZ/+} mice are normally pigmented, except for their white feet and tail tip. *Kit*^{W-lacZ/Kit}^{W-lacZ} embryos lack melanoblasts from E11.5 onwards owing to the null mutation in the *Kit* gene (Bernex et al., 1996). Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) revealed identical *Sbno2* mRNA amounts in the skin of *Kit*^{W-lacZ/Kit}^{W-lacZ} fetuses compared to *Kit*^{W-lacZ/+} fetuses at E17.5, indicating that *Sbno2* is expressed by the melanoblast environment (data not shown). Altogether, our results show that *Sbno2* is expressed in the embryonic and postnatal skin, both in pigment cells and their environment.

Sbno2 is overexpressed in embryonic skin of *Tg(Dct::Sbno2)* mice

To test whether *Sbno2* overexpression in melanocytes affected the development of the melanocyte lineage, we produced *Tg(Dct::Sbno2)* transgenic mice expressing *Sbno2* under a *Dct* minimal promoter driving expression in pigment cells (Mackenzie et al., 1997) (Figure 1a). Eleven *Tg(Dct::Sbno2)* founders were obtained and 9 independent lines derived. Seven transgenic lines generated newborns that expressed the transgene in the skin. On the initial (C57BL/6J x CBA/J) mixed background, transgenics from line *Tg(Dct::Sno)226* showed a diffuse-white-spotting of the coat compared to wild-type (Figure 1b). This line was therefore selected for further analysis of the phenotype caused by the targeted expression of *Sbno2* in the melanocyte lineage.

To check the levels of *Sbno2* overexpression in transgenics during late embryogenesis, we compared *Sbno2* expression in the skin of 5 transgenics and 5 control littermates at E17.5. Real-time quantitative PCR assays were performed with *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)* as endogenous normalizer. *Dct* was used as an additional control for cells of the melanocyte lineage. *Sbno2/Gapdh* expression ratios were not statistically different between transgenic and control skins. However, *Dct/Gapdh* ratios were 2.2 fold lower in transgenics than in control skins (Student t-test, $p < 0.001$), suggesting that there were less melanoblasts in transgenics than in controls (Figure 1c). Comparison of *Sbno2* relative to *Dct* amounts (*Sbno2/Dct*) revealed a 2.2 fold higher ratio in transgenics than in control skins (Student t-test, $p = 0.0015$) (Figure 1c).

To test for *Sbno2* overexpression in transgenic melanocytes after birth, we sorted melanocytes from skins of both C57BL6/J-*Tg(Dct::Sbno2)*; *Pax3*^{GFP/+} and control littermates at P3 and measured *Sbno2* RNA levels in the melanocyte-enriched populations by RT-qPCR, with either *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)* or *actin* as endogenous normalizers. We did not find any statistical difference in *Sbno2/actin* and *Sbno2/Dct* ratios between transgenics and control skins (Student t-test) (Figure 1d).

Altogether, our results suggest that in *Tg(Dct::Sbno2)* mice, *Sbno2* is overexpressed in melanoblasts from embryonic skin but not in melanocytes at P3.

In *Tg(Dct::Sbno2)*; *Tg(Dct::lacZ)* embryos, expression of β -galactosidase is reduced in the skin and increased in nervous structures

Mice carrying the *Tg(Dct::Sbno2)* transgene were backcrossed on the C57BL/6J background for more than 10 generations to get a congenic line. At birth, C57BL/6J-*Tg(Dct::Sbno2)* congenics had a different coat colour than found in the initial (C57BL/6J x CBA/J) mixed background. They displayed a black coat with white belly spot, tail tip and feet (Figure 1e). Occasionally, they had additional small white patches on their back. In the pigmented regions, hair shafts were either as black as in controls or white ; in the white regions, they were all white (Figure 1f). This phenotype suggested that embryonic development of the melanocyte lineage was impaired.

To test this hypothesis, we studied the distribution of β -gal-positive melanoblasts in *Tg(Dct::Sbno2)* embryos carrying the *Dct::lacZ* reporter gene (*Tg(Dct::Sbno2); Tg(Dct::lacZ)*, subsequently noted transgenics). The *Dct::lacZ* reporter gene is expressed in melanoblasts, telencephalon, rostral and caudal dorsal root ganglia (DRG) and spinal nerves (Mackenzie et al., 1997). When compared to *Tg(Dct::lacZ)* control littermates (subsequently noted controls), transgenics showed a marked decrease in melanoblasts density at every stage between E10.5 and E18.5 (Figure 2a and Figure S2). Strikingly, in transgenics, β -gal was highly expressed in peripheral nervous structures, including DRG and spinal nerves all along the rostro-caudal axis from E10.5 onwards, cranial ganglia V and VII to XII from E10.5 to E12.5, and cutaneous nerves from E13.5 to birth (Figure 2a and Figure S2). In rostral and caudal DRG, regions where the reporter gene is also expressed in controls, the β -gal signal was stronger in transgenics because more cells expressed the reporter gene (Figure 2, b and c). In the DRG of transgenics, whatever the position along the rostro-caudal axis, β -gal-positive cells did not express DCT (Figure 2d). This observation suggests that endogenous expression of *Dct* is repressed in DRG and that one or more repressor elements are missing in the *Dct* minimal promoter used in the *Dct::Sbno2* and *Dct::lacZ* constructs, allowing ectopic expression of the reporter gene in cells of the peripheral nervous system.

To test whether the two phenotypes, namely reduced melanoblast density and increased expression of β -gal in nervous structures, were related, we produced transgenics overexpressing *Sbno2* and homozygous for the *Mitf*^{*Δga9*} mutation (*Tg(Dct::Sbno2); Mitf*^{*Δga9/Vga9*}; *Tg(Dct::lacZ)*). *Mitf*^{*Δga9*} is a hypomorphic allele of *Mitf*; as a consequence, very few DCT-positive melanoblasts are determined in

Mitf^{Vg9a/Vga9} homozygous embryos (Hodgkinson et al., 1993). *Tg(Dct::Sbno2); Mitf*^{Vg9a/Vga9}; *Tg(Dct::lacZ)* embryos displayed the same β -gal-positive labelling in nervous structures as *Tg(Dct::Sbno2); Tg(Dct::lacZ)* ones (Figure 2e), proving the β -gal-positive cells did not derive from melanoblasts.

Altogether, our results suggest that in *Tg(Dct::Sbno2); Tg(Dct::lacZ)* embryos, melanoblast density is decreased compared to controls throughout embryonic development whereas β -gal is ectopically expressed in nervous structures.

In *Tg(Dct::Sbno2); Tg(Dct::lacZ)* embryos at E12.5, the proportion of β -galactosidase cells in the DRG that express neural crest cells- and Schwann cell precursors markers is enhanced.

To find out which cell type(s) the β -gal positive cells in DRG belonged to, we performed double immunostainings against β -gal and markers of either multipotent cells derived from the neural crest (that are noted NCC in the rest of the manuscript), Schwann cell precursors (SCP) or neurons. The markers used were nestin, PAX3, SOX10 and p75, which are expressed in both NCC and SCP in DRG; bFABP which is expressed specifically in SCP; PGP9.5 and NFM which are expressed in neurons (Table S3). In both transgenic and control DRG, we found β -gal positive cells that expressed the NCC and SCP markers nestin, SOX10, PAX3, and p75 (Figure S3 and Figure S4) and β -gal positive cells that expressed bFABP (Figure S4). However, very few cells expressed the neuron markers PGP9.5 and NFM (Figure S5). It suggests that in DRG at E12.5, the β -gal positive cells were either NCC or SCP.

Schwann cell (SC) development includes different stages of differentiation: first NCC, then SCP, and immature Schwann cells (iSC) that differentiate either into myelinating SC (mSC) or non-myelinating SC; at E12.5, they have reached the SCP stage (Mirsky et al., 2008). We checked whether the timing of differentiation within the SC lineage could be altered in transgenic DRG. To this aim, we performed immunostainings with antibodies specific for the later SC differentiation stages. We could not find expression of either S100 β , which starts being expressed at the iSC stage, or MBP, which is

expressed in mSC exclusively (Figure S4). Thus no anticipated differentiation of SCP occurred in transgenic DRG at E12.5.

We counted the number and percentage of β -gal positive cells that expressed the markers mentioned above on sections from transgenic and control DRG at E12.5. We found that there was a statistically higher percentage of DRG cells that expressed both β -gal and either SOX10, PAX3, p75 and bFABP in transgenics than in controls (Table 1). As the higher number of β -gal positive cells in transgenic DRG could explain the difference observed, we calculated the proportions of double labelled cells within the β -gal positive populations. We found a higher proportion of β -gal positive cells expressing SOX10 and a lower proportion of β -gal positive cells expressing PGP9.5 in transgenic DRG (Table 2). For the other markers, no difference in the proportions of double labelled cells reached statistical significance when considering the β -gal positive populations only (Table 2).

The DRG of both transgenics and controls contained cells expressing NCC, SCP and neuron markers but that were not labelled with the antibody against β -gal (Figures S3 to S5). To test whether the relative distribution of NCC, SCP and neurons were altered in the DRG of transgenics, we counted the number of cells expressing markers of either NCC, SCP or neurons in the DRG of transgenics and controls, independently of their expression of β -gal. At E12.5, the proportions of cells expressing SOX10, PAX3, p75 or bFABP were higher in transgenic DRG than in controls (Table 3), suggesting a higher number of NCC and SCP in transgenic DRG. Interestingly, the number of cells expressing nestin, a NCC marker also expressed in stem cells and multilineage progenitor cells (Wiese et al., 2004) was comparable in transgenic and control DRG. The proportions of NFM- or PGP9.5-positive cells in DRG were also higher in transgenic DRG (Table 3), suggesting a higher number of neurons in transgenic DRG. The proportions of cells that were not immunostained with a marker for NCC, SCP or neurons was lower in transgenic DRG than in controls (Table S4).

Our results show that there were more cells expressing β -gal in transgenic DRG than in controls, and that these cells were predominantly NCC and SCP. Moreover, transgenic DRG contained more NCC, SCP and neurons than control DRG. Altogether, this suggests an increase in the number of NCC in

transgenic DRG, this bigger pool of NCC could in turn give rise to a higher number of SC and neurons.

Anticipated hair greying and expression of β -galactosidase in cutaneous nerves of *Tg(Dct::Sbno2); Tg(Dct::lacZ)* mice

As transgenic embryos displayed defects in melanoblast, Schwann cell and neuron development, we looked for a coat colour and nervous phenotype after birth. Transgenics started greying around 3 months of age but never turned completely white (Figure 3a). This phenotype suggested a defect in melanocyte stem cell maintenance. To investigate this hypothesis, we studied the distribution of β -gal-positive cells in hair follicles (HF) from the back skin of transgenics and controls carrying the *Dct::lacZ* reporter gene. During the anagen of the first hair growth, every hair bulb contained differentiated, functional melanocytes producing pigmented hair shaft. However, very few β -gal-positive cells were found in the outer root sheath, between the bulge and the hair bulb, and there was a prominent β -gal-positive network around several hair follicles at the bulge level (Figure 3b). From the second hair cycle, some hair bulbs contained either no or few β -gal-positive cells that did not produce any pigment; the corresponding hair shafts were white. The other hair bulbs were comparable to wild-types; the β -gal-positive network was still present and as developed as during the first anagen (Figure 3c). When a new anagen was induced by depilation in 2-month-old transgenics, the proportion of hair bulb devoid of functional melanocytes producing white hairs increased, and the β -gal-positive network was more extensive than in younger mice (Figure 3d). In one-year old transgenics, most HF did not contain any β -gal-positive cells and produced white hair shaft; the β -gal-positive network was loose and less prominent (Figure 3e). Interestingly, in controls, we frequently observed such a β -gal-positive network in the skin of one-year old mice, but not of younger mice (Figure 3e). Thus such a network may be a hallmark of aging skin.

As the β -gal-positive network had the same localization and distribution as the cutaneous nervous plexuses (Botchkarev et al., 1997), we tested whether it expressed markers of neurons and Schwann cells. The β -gal-positive network in transgenic skin expressed both NFM and S100 β . In control skin,

NFM-positive, S100 β -positive cutaneous nervous plexuses did not express β -gal (Figure 3f and Figure S5).

When transgenics grew older, the number of β -gal-positive melanocytic cells within the HF dwindled whereas ectopic β -gal-positive cells were found in cutaneous nerves in close vicinity of HF. It raised the question whether the β -gal-positive cells of the nervous plexuses derived from melanocytic cells, for instance from melanocyte stem cells that would give rise to Schwann cells or neurons at the expense of melanocytic cells. To test this hypothesis, we studied the distribution of β -gal-positive cells in HF from *Tg(Dct::Sbno2); Tg(Dct::lacZ); Mitf^{Vg9a/Vga9}* mice, devoid of melanocytic lineage. In these mice, the β -gal-positive network was still present and even overdeveloped compared to *Mitf^{Vg9a/Vga9}; Tg(Dct::lacZ)* and *Tg(Dct::Sbno2); Tg(Dct::lacZ)* controls (Figure 3g). Our data indicate that the β -gal-positive network does not derive from melanocytic cells. On the contrary, it is more developed when no melanocytic cell is present in the skin.

Lesions in peripheral nerves of *Tg(Dct::Sbno2)* ; *Tg(Dct::lacZ)* mice

Given β -gal was ectopically expressed in the nervous system during embryonic development and in the skin during postnatal life, we looked whether it was still expressed in the nervous system of *Tg(Dct::Sbno2); Tg(Dct::lacZ)* adults. Beta-gal was expressed in trigeminal and cutaneous nerves, faintly in controls, and strongly in transgenics (Figure 4, a and b).

We used double immunostainings against β -gal and either NFM, S100 β and MBP to characterize the cell types that expressed β -gal in peripheral nerves. We found that the β -gal signal was much stronger in transgenic than control nerves. The β -gal positive cells were interspersed within the endoneurium and possessed long interdigitating processes (Figure 4, c and d). The NFM signal was less evenly distributed in transgenics than controls, with larger NFM-immunonegative regions in transgenics. Beta-gal and NFM signals were mutually exclusive in both transgenics and controls (Figure 4c). The immunolabelling for S100 β was higher in transgenic than in control nerves. We could not find any β -gal-positive, S100 β positive cells in controls and only a small subpopulation of β -gal-positive cells expressed S100 β in transgenics (Figure 4d). The MBP signal was strong and β -gal and MBP signals

were mutually exclusive in both controls and transgenics (Figure 4e and data not shown). According to these data, it is unlikely that the β -gal positive cells in the peripheral nerves of transgenics were either NFM-expressing axons or MBP-expressing myelinating Schwann cells, and most of them were not S100 β -positive, MBP-negative non-myelinating Schwann cells. Together with their localization, morphology and lack of expression of axons and Schwann cells markers, these observations strongly suggest they were endoneurial fibroblasts (Joseph et al., 2004).

To test this hypothesis, we performed standard histology. Peripheral nerves from transgenics displayed axonal loss and endoneurial fibrosis (Figure 4f). The regions of endoneurial fibrosis coincided with those of β -gal-immuoreactivity. The histological structure in the central nervous system was comparable between transgenics and controls (Figure 4, g and h) and data not shown),

Altogether, our results suggests that the *Tg(Dct::Sbno2)* transgene induces lesions of endoneurial fibrosis and axonal loss in the peripheral nerves whereas the process of myelination of the remaining axons is not impaired.

***Tg(Dct::Sbno2)* mice are spontaneously hyperactive.**

To test whether the lesions in peripheral nerves had a clinical impact, we observed the behaviour and activity of the *Tg(Dct::Sbno2)* transgenics. Some transgenics were hyperactive and easily stressed (See movie in Supplementary data). Thus we quantified and compared the spontaneous locomotor activity of couples of transgenics and control littermates at different ages in an actimeter. We recorded movement duration, low speed move (<1 cm/s) and high speed move (>9 cm/s) durations, motionless activity duration, inactivity duration, ambulatory distance, and average speed. We could not found any difference reaching statistical significance between transgenics and mutants at 2 and 3 months for any of the parameters recorded (Figure 5a and Table 3). However, at both ages, we noticed some mice whose activity was considerably higher in the transgenic groups than in the control groups and with a high propensity to circle (Figure 5b and movie in the Supplementary Materials and Methods). The distance covered by transgenics at 4 months within the period of the recording was significantly higher than in controls and the difference was even more marked with older mice (Supplementary Figure 5a and Table 4). From 7 months, transgenics spent a significantly longer time moving, and moving at

high speed, than controls (Table 4), explaining the longer distance covered. The number of transgenics showing hyperactivity increased as they were older and by 14 months, all transgenics were hyperactive (Figure 5b) and all of them displayed a circling phenotype (data not shown). Altogether, our results show that transgenics are spontaneously hyperactive. Hyperactivity has a variable time of appearance and is evolutive so that all older transgenics display the phenotype.

MATERIALS AND METHODS

Animals

C57BL/6J-*Tg(Dct::lacZ)Al2Jkn* (referred to as *Tg(Dct::lacZ)*) mice were a kind gift from I. Jackson (Mackenzie et al., 1997); C57BL/6J-*Pax3^{tm4Buck}* mice (referred to as *Pax3^{GFP/+}*) from M. Buckingham (Relaix et al., 2005); C57BL/6J-*Tg(Tyr-Cre)1Lru* (referred to as *Tg(Tyr::cre)* (Delmas et al., 2003) and C57BL/6J-*Mitf^{mi-Vga9}/Mitf^{mi-Vga9}* (Tachibana et al., 1992) from L. Larue (Institut Curie, Orsay). Transgenic C57BL/6J-*Kit^{tm1Alf/+}* mice (referred to as *Kit^{W-lacZ/+}* mice) were generated at the Alfort Veterinary School (Bernex et al., 1996). 129/Sv-*Kit^{W-v/+}* mutant mice were bred in our facility. Animal care and use were approved by the local ethical committee (agreement #12-085 from COMETH Anses/ENVA/UPEC) in compliance with the European Union Standards.

For embryo collection, the day of finding the copulation plug was designated day 0 of pregnancy.

Generation of *Sbno2* knock-out mice

Baygenomics ES cells line XN464 (129/Ola background), carrying the pGR2lxf gene-trap vector inserted within *Sbno2* intron 4, were purchased from MMRRC (<http://www.mmrrc.org/>). Integration site of pGR2lxf in XN464 cells was checked by PCR and sequencing. The ES cells were microinjected into blastocysts from C57BL/6N mice. Four male chimeras were identified by coat colour and crossed with C57BL/6N and 129/Ola females. Their offsprings were genotyped by PCR (see below). Germline transmission was obtained for three chimeras. A congenic line was derived by backcrossing the F1 for more than 10 generations on the C57BL/6N background. The gene-trapped allele is referred to as *Sbno2^{Gt(pGT2Lxf)1Alf}*.

Generation and screening of *Tg(Dct::Sbno2)* transgenic mice

Dct-SV40pA vector containing a 3.7kb genomic fragment (-3280 to +445 relative to the transcription initiation site) from mouse *Dct* gene and a 0.8kb *SV40pA* fragment (*SV40* small t intron and polyadenylation sequences) was constructed as previously described (Zhao and Overbeek, 1999). *Dct-SV40pA* harbored *XmaI* and *EcoRV* cloning sites. *Sbno2* mRNA was reverse transcribed, amplified with primers (5'-TTAATTACCGGTTACAACCTGCCGCTGCCAGCACCACA-3') containing an *AgeI* site and (5'-ATGATATCAGCCCATAGGCCTTGCTGCCAGTACA-3') containing an *EcoRV* site, cloned, and sequenced. The *Sbno2 AgeI-EcoRV* fragment was inserted into *Dct-SV40pA*. The DNA fragment was released by digestion with *NotI* and *SalI* and microinjected in mouse eggs. Founder mice were identified by PCR (see infra). Transgene expression was tested by RT-PCR with primer (5'-CACTCCACGTGCGATTACGC-3') as described (Smith et al., 2001).

Genotyping

The *Sbno2* wild-type and gene-trapped alleles were identified by PCR. Primers wt-F (5'-TTGAGATTCCTCCTGCAAGTGTGTG-3') and wt-R (5'-AGGCAGGCTGATCTCTGTGAGTTTG-3') flanking the integration site were used to identify the wild-type allele, and wt-F and a reverse primer specific for the trap vector (5'-TCCAACCTCCGCAAACCTCCTATTTC-3') were used to identify the trapped allele, with an annealing temperature of 60°C. The PCR products were 577 bp and 445 bp long, respectively. The *Tg(Dct::Sbno2)* transgene was identified by PCR using primers (5'-GGCGAGAAGCTCCCCTCATT-3') within *Dct* promoter and (5'-CCACCCCGGACAGTGCAGGA-3') in *Sbno2* cDNA, with an annealing temperature of 59°C. PCR fragment size was 525 bp. The *Mitf*^{Vga9} allele was identified by PCR using primers (5'-AGCAGGTGACACTAGGTTCC-3') and (5'-CCGTAATGGGATAGGTTACG-3') in *Mitf* cDNA, with an annealing temperature of 59°C. PCR fragment size was 525 bp. Embryos sexing was performed by PCR amplification of both the Y-linked gene *Smcy/Jarid1d* and the X-linked gene *Smcx/Jarid1c* (Agulnik et al., 1994) with a single set of primers : *Smc* forward (5'-TGAAGCTTTTGGCTTTGAG-3') and *Smc* reverse (5'-CCACTGCCAAATTCTTTGG-3') with an

annealing temperature of 55°C. PCR fragment sizes were 301 and 330 bp for *Smcy* and *Smcx* respectively. PCRs to identify *Kit*^{W-lacZ} and *Pax3*^{GFP} alleles, *Tg(Tyr-Cre)1Lru* and *Tg(Dct::lacZ)* transgenes were performed as previously described (Aubin-Houzelstein et al., 2008; Djian-Zaouche et al., 2012).

Relative quantification of transcripts

Sbno2, *Gapdh* and *Dct* mRNA amounts were measured in the skin of 10 fetuses at E17.5, 5 *Tg(Dct::Sbno2)* transgenics and 5 controls. The skin containing epidermis, dermis and subcutaneous fat was taken and frozen at -80°C. Poly(A)⁺ RNA were isolated from the skin using Dynabeads mRNA DIRECT kit (Invitrogen, Life Technologies SAS, St Aubin, France) and reverse transcribed as described (Daubas et al., 2000). cDNAs were amplified using an ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Life Technologies SAS, St Aubin, France). *Gapdh* mRNA was used as endogenous reference to normalize the mRNA amounts. For detection of *Sbno2* and *Dct* transcripts, specific primers located in different exons, were as follows: *Sbno2* (5'-GAGTGCAGACCGTGCCATT-3') and (5'-CGGGTGCTGAGACCTGGTT-3'); *Dct* (5'-AATTCTTCAACCGGACATGCA-3') and (5'-GCCGGTCCAGCCGAA-3'). The TaqMan® probes for *Sbno2* and *Dct* were (5'Fam-ACAGTTTGGCCGCACCCACAGGT-3') and (5'Vic-CTTTGCTGGTTATAATTG TGGAGGCTGCA-3') respectively. *Gapdh* transcripts were amplified using probes and primers from TaqMan® reagents (Applied Biosystems, Life Technologies SAS, St Aubin, France). The PCR reactions were done in duplicate in separate tubes, using TaqMan® Universal PCR Master Mix, with 300nM of each primer and 200nM of TaqMan® probes. The cycling sequence consisted of an initial step at 50°C for 2 min and a denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. The relative standard curve method was used to quantify the results (Giulietti et al. 2001). Dilutions 100, 400, 1,600 and 6,400 of a cDNA prepared from wild-type skin were used to construct standard curves for *Sbno2*, *Dct* and *Gapdh* amplifications. *Sbno2*, *Dct* and β -actin mRNA amounts were measured in the melanocyte-enriched cell populations from the skins of 3 *Tg(Dct::Sbno2)* ; *Pax3*^{GFP/+} and 3 *Pax3*^{GFP/+} control littermate pups at P3. Skin cell suspensions were FACS-sorted based on GFP expression as previously described (Djian-

Zaouche et al., 2012). Total RNA was isolated with RNA Nucleospin Kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. Purity of RNAs was assessed by a ratio of absorbance at 260 nm and 230 nm >1.7. Quality of RNAs was checked on agarose gel. Two hundred nanograms of RNA were used for reverse transcription with the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas, France). cDNA were amplified using the Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Fermentas, France). PCR reactions were performed with Taq DNA Polymerase from MP Biomedicals on a Mastercycle Eppendorf thermocycler. Primers used were as follows: *Sbno2* (5'-AGAGCAGCGACTTTCCTCAG-3') and (5'- CCCACTAGGTATGAACAGCTTG-3'); *Dct* (5'-TTCAACCGGACATGCAAATGC-3') and (5'- GCTTCTTCCGATTACAGTCGGG-3'); β -actin (5'- TCCACACCCGCCACCAGTTC) and (5'- GACCCATTCCCACCATCACACC). The amplicons sizes were respectively 200 bp, 97 bp and 197 bp. qPCR reactions were performed on a Roche Light Cyclers Carousel-based system 2.0 (Roche). All PCR and qPCR products were examined qualitatively on agarose gels.

Melanocyte and melanoblast cell lines

Melb-a murine melanoblasts (Sviderskaya et al., 1995) and melan-a murine melanocytes (Bennett et al., 1987) were grown as described.

Samples preparation, sectioning and staining

For X-gal staining, embryos and postnatal skins were fixed in 4% PFA at 4°C for 20 to 45 min depending on embryonic stage or tissue thickness. X-gal staining was performed as previously described (Aubin-Houzelstein et al., 2008). Hair follicles were isolated from skin samples using fine syringe needles and were mounted in Mowiol (Polysciences Europe, Eppelheim, Germany). For standard histology, skin samples were fixed overnight in 4% formaldehyde/PBS at 4°C, embedded in paraffin, 4 μ m sectioned following standard procedures and counterstained with Hemalun-Eosin.

To stain myelin/myelinating neurons, paraffin-embedded peripheral nerves sections were stained in Luxol Fast blue solution using standard procedure. For immunostainings, embryos or skins from P8-P12 (stage VI of 1st anagen) mice were fixed overnight at 4°C in 0.5% PFA, then washed at 4°C in

4% sucrose, cryopreserved overnight at 4°C in 15% sucrose in PBS, then incubated for 2h at 40°C in 15% sucrose, 7% gelatin in PBS and finally embedded in 15% sucrose, 7% gelatin in PBS, frozen in liquid nitrogen, and 10 µm sectioned with a cryostat.

Immunofluorescence

The primary antibodies used in this study are listed in Supplementary Table S1. Immunostaining methods are detailed in the Supplementary data and in Supplementary Table S2.

Image acquisition

Brightfield and fluorescent microscopy was performed with a Zeiss Axioplan 2 Imaging microscope with ApoTome™ (upright stand) using Plan-NEOFLUAR (10, 25 and 40 magnification) or Plan-APOCHROMAT (63 and 100 magnification) objective lenses, with 0.3, 0.8, 1.3, 1.4 and 1.4 numerical apertures respectively. Images were acquired with either an Axiocam HRc (colour imaging) or an Axiocam MRm (fluorescence imaging) camera (Zeiss, Germany) coupled to Zeiss Axiovision 4.4 software. Minimal image processing was performed with Adobe Photoshop.

Home cage activity quantification and electrophysiological analysis

To quantify mice activity, couples of *Tg(Dct::Sbno2)* and control littermates at 2, 3, 4, 7, 14 and 17 months were placed individually in an ActiV-Meter (Bioseb, Vitrolles, France) over a 14 hours period from 5 pm to 7 am. During the experiment, food and water were provided *ad libitum*. The parameters recorded were movement duration, low speed move (<1 cm/s) and high speed move (>9 cm/s) durations, motionless activity duration, inactivity duration, ambulatory distance, and average speed calculated using moving period of time. For each mouse, three recordings were performed in a row and means and standard errors of the means from the three experiments were calculated.

Electrophysiological analysis was performed as previously described (Blot et al., 1995) on 2 couples of *Tg(Dct::Sbno2)* and control littermates at 8 months.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the StatViewF-4.51.3.PPC software from Abacus Concepts (Berkeley, New Jersey, USA). Data in the text are expressed as means±standard errors of the means. Distribution normality was tested by comparing the distribution observed to a normal distribution with the same mean and standard deviation and use of a Kolmogorov-Smirnov test. Variances were compared with an F-test. Means were compared with a Student's *t*-test for normally distributed values with equal variances and with a Mann-Whitney U-test otherwise. Distributions were compared with a Pearson's Chi-square test. Percentages were compared with an exact Fisher test.

Tables

Table 1: The proportions of β -gal positive cells expressing NCC or SCP markers are higher in transgenic DRG than in control DRG at E12.5

Type of double labelled cells	% of double labelled cells in		Chi 2 test
	Tg DRG	Ctrl DRG	
β gal+, nestin+	11.8% (n=6; N=746)	11.8% (n=6; N=769)	NS
β gal+, SOX10+	42.0% (n=6; N=982)	29.9% (n=6; N=1008)	***
β gal+, PAX3+	23.4% (n=6; N=1160)	11.2% (n=6; N=1048)	***
β gal+, p75+	22.1% (n=2; N=371)	10.3% (n=2; N=359)	***
β gal+, bFABP+	33.0% (n=4; N=531)	15.8% (n=4; N=562)	***
β gal+, PGP9.5+	1.4% (n=5; N=725)	2.9% (n=6; N=916)	***
β gal+, NFM+	3.0% (n=5; N=872)	2.1% (n=4; N=818)	NS

Double immunolabellings were performed as described in the Supplementary data. DAPI counterstaining of nuclei was used to count the total number of cells in a DRG section. Percentages are the numbers of double labelled cells relative to the total numbers of cells in the DRG. n: number of DRG examined; N: number of cells counted. Chi 2: Chi square test : NS: non significant; ***: $p < 0.001$.

Table 2: Proportions of cells expressing NCC, SCP or neuronal markers in the β -gal positive subpopulations of transgenic DRG and control DRG at E12.5

Type of double labelled cells	Tg DRG	Ctrl DRG	Chi 2 test
β gal+, nestin+	23.8% (370)	31.9% (285)	NS
β gal+, SOX10+	89.2% (462)	61.9% (486)	***
β gal+, PAX3+	81.7% (333)	62.6% (187)	NS
β gal+, p75+	41.2% (199)	27.4% (135)	NS
β gal+, bFABP+	62.3% (281)	64.5% (138)	NS
β gal+, PGP9.5+	2.8% (360)	5.8% (469)	*
β gal+, NFM+	7.0% (371)	9.1% (186)	NS

Percentages are the numbers of double labelled cells relative to the numbers of β -gal positive cells in the DRG. The numbers between brackets are the numbers of β -gal positive cells counted. Chi 2: Chi square test : NS: non significant; *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$.

Table 3: Proportions of cells expressing NCC, SCP or neuronal markers in DRG of transgenic and controls at E12.5

Type of labelled cells	% of labelled cells in		Chi 2 test
	Tg DRG	Ctrl DRG	
nestin+	26.7% (n=6; N=746)	27.2% (n=6; N=769)	NS
SOX10+	43.2% (n=6; N=982)	36.2% (n=6; N=1008)	**
PAX3+	51.4% (n=6; N=1160)	37.5% (n=6; N=1048)	***
p75+	48.5% (n=2; N=371)	34.0% (n=2; N=359)	***
bFABP+	54.6% (n=4; N=531)	43.8% (n=4; N=562)	***
PGP9.5+	37.1% (n=5; N=725)	27.0% (n=6; N=916)	***
NFM+	20.0% (n=5; N=872)	11.5% (n=4; N=818)	***

Percentages are the numbers of cells that were not labelled with either antibody relative to the total numbers of cells in the DRG. n: number of DRG examined; N: number of cells counted. Chi 2: Chi square test : NS: non significant; **:p<0.01 ***: p<0.001.

Table 4: Comparison of spontaneous locomotor activity parameters in transgenic and control mice

Age (months)	Number of mice		Distance covered in 14 hr (km)			Average speed (cm/s)		
	Tg	Ctrl	Tg	Ctrl	p value	Tg	Ctrl	p value
2	3	3	4.05 ± 4.13	1.15 ± 0.41	NS	10.8 ± 4.3	9.6 ± 0.7	NS
3	5	5	3.22 ± 1.87	2.02 ± 0.97	NS	10.3 ± 4.3	6.7 ± 2.1	NS
4	4	3	3.45 ± 1.61	0.87 ± 0.43	0.02	11.7 ± 4.3	4.4 ± 1.1	0.01
7	4	4	3.94 ± 1.35	1.36 ± 0.56	<0.001	13.2 ± 4.1	5.41 ± 1.4	<0.001
14	3	3	3.55 ± 0.87	0.73 ± 0.34	<0.001	11.4 ± 1.4	4.0 ± 1.1	<0.001
17	1	1	4.84 ± 0.13	0.67 ± 0.11	-	15.2 ± 0.7	3.4 ± 0.1	-

Age (months)	Number of mice		Global move (%)			High speed move (%)			Low speed move (%)		
	Tg	Ctrl	Tg	Ctrl	P value	Tg	Ctrl	P value	Tg	Ctrl	P value
2	3	3	61 ± 12	50 ± 10	NS	41 ± 15	31 ± 10	NS	20 ± 5	20 ± 2	NS
3	5	5	58 ± 11	56 ± 14	NS	43 ± 1	42 ± 14	NS	14 ± 3	14 ± 2	NS
4	4	3	53 ± 17	40 ± 13	NS	44 ± 17	29 ± 13	NS	9 ± 2	11 ± 1	0.01
7	4	4	59 ± 10	46 ± 11	0.03	48 ± 11	34 ± 11	0.05	11 ± 3	12 ± 2	NS
14	3	3	61 ± 9	33 ± 9	<0.001	49 ± 10	22 ± 8	0.01	12 ± 2	12 ± 2	NS
17	1	1	65 ± 4	39 ± 6	-	57 ± 4	23 ± 4	-	8 ± 0	16 ± 2	-

For each parameter recorded (see the Material and Methods section for their description), results are given as means ± standard errors of means; the corresponding p-value for the Mann-Whitney U-test or exact Fisher test is indicated.

Figure Legends

Figure 1 : *Tg(Dct::Sbno2)* transgene and mice

(a) : *Tg(Dct::Sbno2)* construct. Arrow: transcription initiation site. (b): a wild-type mouse (Ctrl, left), littermate of the *Tg(Dct::Sbno2)* mouse shown in right (Tg), on the initial (C57BL/6J x CBA/J) mixed

background. Note the coat colour dilution of the transgenic mouse. (c) : RT-qPCR quantification of *Sbno2* and *Dct* relative expression in the skin of 5 *Tg(Dct::Sbno2)* (Tg, white histograms) and 5 control littermate (Ctrl, black histograms) fetuses at E17.5. Bars : standard errors of means (sem) ; * : Student t-test, $p < 0.05$; ** : Student t test, $p < 0.01$. (d) : RT-qPCR quantification of *Sbno2* and *Dct* relative expression in the melanocyte-enriched cell populations from the skins of 3 *Tg(Dct::Sbno2)* ; *Pax3*^{GFP/+} (Tg, white histograms) and 3 *Pax3*^{GFP/+} control littermate (Ctrl, black histograms) pups at P3. Cell suspensions were FACS-sorted based on GFP expression. Bars: standard errors of means (sem). (e): left : Coat colour phenotype of two C57BL/6J -*Tg(Dct::Sbno2)* congenic pups flanking a wild-type littermate at P12 ; right : belly of a C57BL/6J -*Tg(Dct::Sbno2)* congenic pup at P12. (f) : Groups of hair follicles (HF) dissected from the skin of a C57BL/6J -*Tg(Dct::Sbno2)* congenic pup (Tg) and from the skin of a control littermate (Ctrl) at P9. The HF of the C57BL/6J -*Tg(Dct::Sbno2)* pup were dissected from a black region (left), from an area at the limit between a black and a white region (middle), and from a white patch (right).

Figure 2 : Expression of β -galactosidase in *Tg(Dct::Sbno2)*; *Tg(Dct::lacZ)* and control embryos

(a) : Detection of β -gal activity by X-gal staining on whole mount embryos at E12.5. Tg: C57BL/6J -*Tg(Dct::Sbno2)* ; *Tg(Dct::lacZ)* (transgenic). Ctrl : C57BL/6J- *Tg(Dct::lacZ)* littermate (control). (b) : Immunostaining against β -gal (green) on sections of DRG from embryos at E12.5. The DRG in control and transgenic were chosen at the hindlimb level. DAPI nuclear counterstaining is present in every fluorescent panel. (c) : Comparison of the percentages of β -gal-positive cells on sections of DRG from embryos at E12.5. Cells immunostained with the anti- β -gal antibody were counted on 15 sections from 11 control embryos and 15 sections from 10 transgenic embryos, for a respective total of 5480 and 5387 cells. *** : Chi square test, $p < 0.001$. (d) Immunostaining against DCT (green) and β -gal (red) on a section of a DRG from a transgenic embryo at E12.5. (e) : Detection of β -gal activity by X-gal staining on whole skins from fetuses at E18.5. Tg : C57BL/6J-*Tg(Dct::Sbno2)* ; *Mitf*^{Vg9a/+} ; *Tg(Dct::lacZ)* ; *Mitf*^{Vg9a} : C57BL/6J-*Mitf*^{Vg9a/Vg9a} ; *Tg(Dct::lacZ)* ; Tg *Mitf*^{Vg9a} : C57BL/6J -*Tg(Dct::Sbno2)* ; *Mitf*^{Vg9a/Vg9a} ; *Tg(Dct::lacZ)* ; Ctrl : C57BL/6J- *Mitf*^{Vg9a/+}. All fetuses were littermates. Section thickness: 1 μ m. Bars: (a) = 1 mm; (b) = 20 μ m; (d) = 50 μ m; (e) = 500 μ m.

Figure 3 : Coat colour phenotype and expression of β -galactosidase in the skin of

Tg(Dct::Sbno2); Tg(Dct::lacZ) transgenics and controls

(a) : coat colour phenotype of C57BL/6J-*Tg(Dct::Sbno2)* ; *Tg(Dct::lacZ)* and *Tg(Dct::lacZ)* control littermates through time. 1st HG : first hair growth (P12) of 2 transgenics (left), and 2 controls (right); 2d HG : second hair growth (P32) ; 3d HG : depilation-induced third hair growth (P62). * and § indicate the same transgenic and the same control littermate at P12, P32, P62 and 1 year. (b-e) : distribution of β -gal positive cells in hair follicles from C57BL/6J-*Tg(Dct::Sbno2)* ; *Tg(Dct::lacZ)* (Tg) and *Tg(Dct::lacZ)* control littermates (Ctrl). (b) : 1st HG : P10. (c) : 2d HG : P36. (d) : depilation-induced 3d HG (P74). (e) : 1 year. (f) : double immunolabellings against β -gal and S100 β on groups of HF from C57BL/6J-*Tg(Dct::Sbno2)* ; *Tg(Dct::lacZ)* at P9 (first HG). Immunostaining for β gal is shown in green, for S100 β in red. DAPI counterstaining (blue) is present in all panels. BF: Brightfield. Optical sections thickness = 1 μ m. (g): distribution of β -gal positive cells in HF at P11 (first HG). Ctrl : C57BL/6J- *Mitf*^{Vg9a/+} ; Tg : C57BL/6J-*Tg(Dct::Sbno2)* ; *Mitf*^{Vg9a/+} ; *Tg(Dct::lacZ)* ; *Mitf*^{Vga9} : C57BL/6J-*Mitf*^{Vg9a/Vga9} ; *Tg(Dct::lacZ)* ; Tg *Mitf*^{Vga9} : C57BL/6J -*Tg(Dct::Sbno2)* ; *Mitf*^{Vg9a/Vga9} ; *Tg(Dct::lacZ)*.

Bars: (b) = 250 μ m; (c), (d), (e), (g) = 200 μ m; (f) = 50 μ m.

Figure 4 : Lesions in peripheral nerves of *Tg(Dct::Sbno2)* ; *Tg(Dct::lacZ)* mice

(a-b) : Detection of β -gal activity by X-gal staining in peripheral nerves of a transgenic (Tg) and a control (Ctrl) littermate at P9. (a): whole mount floors of the cranial cavity focused on the trigeminal (V) nerves that display X-gal staining (faint in Ctrl, intense in Tg); (b) whole bodies after removal of the skin showing X-gal positive cutaneous nerves. (c, d, e): double immunolabellings on transversal sections of sciatic nerves from a transgenic and a control littermate at 8 months. Green: immunostaining for β gal; red: immunostaining for NFM (c), S100 β (d) and MBP (e). (f): transverse sections of sciatic nerves from a transgenic and a control littermate at 1 year, hematoxylin-eosine-saffron stain. (g-h) transverse sections of cerebellums from a transgenic and a control littermate at 8

months, hematoxylin-eosine-saffron stain (g), Luxol Fast Blue stain, histochemical stain for myelin (h). Bars = 50 μ m in all pictures.

Figure 5 : Comparison of the distance covered by transgenics and control littermates during spontaneous activity recording experiments

(a) : Means of the distance covered in 14 hours in 2, 7 and 14 months old mice. Means were compared with a Mann-Whitney U-test : NS : non significant ; *** : $p < 0.001$. (b) : means of the distance covered for each mouse of the groups shown in (a). Couples of littermates, 1 transgenic and 1 control were recorded, 3 recordings were performed for each mouse. Tg : *Tg(Dct::Sbno2)* mice. Ctrl: control littermates. Bars = standard errors of means.

REFERENCES

- Agulnik, A. I., Mitchell, M. J., Mattei, M. G., Borsani, G., Avner, P. A., Lerner, J. L., and Bishop, C. E. (1994). A novel X gene with a widely transcribed Y-linked homologue escapes X-inactivation in mouse and human. *Hum Mol Genet* 3, 879-84.
- Aubin-Houzelstein, G., Djian-Zaouche, J., Bernex, F., Gadin, S., Delmas, V., Larue, L., and Panthier, J. J. (2008). Melanoblasts' proper location and timed differentiation depend on Notch/RBP-J signaling in postnatal hair follicles. *J Invest Dermatol* 128, 2686-95.
- Bennett, D. C., Cooper, P. J., and Hart, I. R. (1987). A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer* 39, 414-8.
- Bernex, F., De Sepulveda, P., Kress, C., Elbaz, C., Delouis, C., and Panthier, J. J. (1996). Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in *WlacZ/+* and *WlacZ/WlacZ* mouse embryos. *Development* 122, 3023-33.
- Blot, S., Poirier, C., and Dreyfus, P. A. (1995). The mouse mutation muscle deficient (*mdf*) is characterized by a progressive motoneuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 54, 812-25.
- Botchkarev, V. A., Eichmuller, S., Johansson, O., and Paus, R. (1997). Hair cycle-dependent plasticity of skin and hair follicle innervation in normal murine skin. *J Comp Neurol* 386, 379-95.
- Daubas, P., Tajbakhsh, S., Hadchouel, J., Primig, M., and Buckingham, M. (2000). *Myf5* is a novel early axonal marker in the mouse brain and is subjected to post-transcriptional regulation in neurons. *Development* 127, 319-31.
- Delmas, V., Martinozzi, S., Bourgeois, Y., Holzenberger, M., and Larue, L. (2003). Cre-mediated recombination in the skin melanocyte lineage. *Genesis* 36, 73-80.
- Djian-Zaouche, J., Campagne, C., Reyes-Gomez, E., Gadin-Czerw, S., Bernex, F., Louise, A., Relaix, F., Buckingham, M., Panthier, J. J., and Aubin-Houzelstein, G. (2012). *Pax3(GFP)* , a new reporter for the melanocyte lineage, highlights novel aspects of PAX3 expression in the skin. *Pigment Cell Melanoma Res* 25, 545-54.

- Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74, 395-404.
- Joseph, N. M., Mukoyama, Y. S., Mosher, J. T., Jaegle, M., Crone, S. A., Dormand, E. L., Lee, K. F., Meijer, D., Anderson, D. J., and Morrison, S. J. (2004). Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* 131, 5599-612.
- Mackenzie, M. A., Jordan, S. A., Budd, P. S., and Jackson, I. J. (1997). Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev Biol* 192, 99-107.
- Mirsky, R., Woodhoo, A., Parkinson, D. B., Arthur-Farraj, P., Bhaskaran, A., and Jessen, K. R. (2008). Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J Peripher Nerv Syst* 13, 122-35.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435, 948-53.
- Smith, R. D., Ogden, C. W., and Penny, M. A. (2001). Exclusive amplification of cDNA template (EXACT) RT-PCR to avoid amplifying contaminating genomic pseudogenes. *Biotechniques* 31, 776-8, 780, 782.
- Sviderskaya, E. V., Wakeling, W. F., and Bennett, D. C. (1995). A cloned, immortal line of murine melanoblasts inducible to differentiate to melanocytes. *Development* 121, 1547-57.
- Tachibana, M., Hara, Y., Vyas, D., Hodgkinson, C., Fex, J., Grundfast, K., and Arnheiter, H. (1992). Cochlear disorder associated with melanocyte anomaly in mice with a transgenic insertional mutation. *Mol Cell Neurosci* 3, 433-45.
- Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K. V., Tarasova, Y., Wersto, R. P., Boheler, K. R., and Wobus, A. M. (2004). Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61, 2510-22.
- Zhao, S., and Overbeek, P. A. (1999). Tyrosinase-related protein 2 promoter targets transgene expression to ocular and neural crest-derived tissues. *Dev Biol* 216, 154-63.

Figure 1

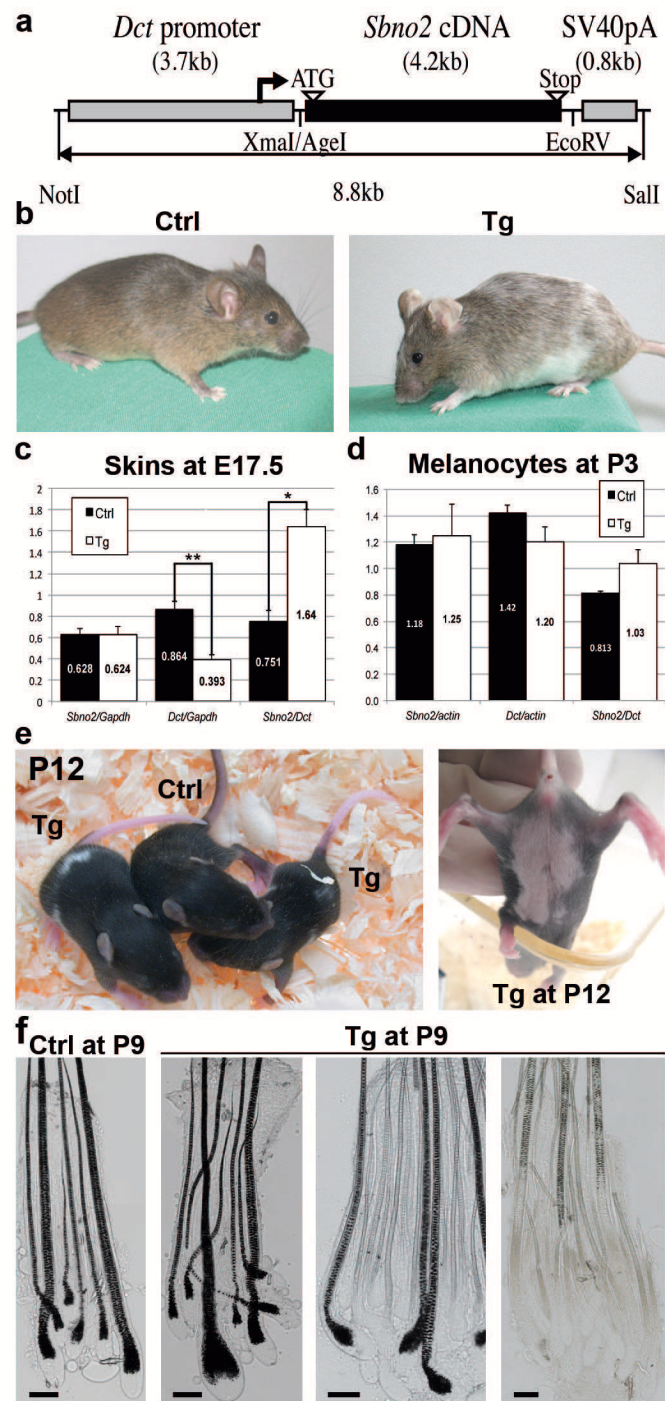


Figure 2

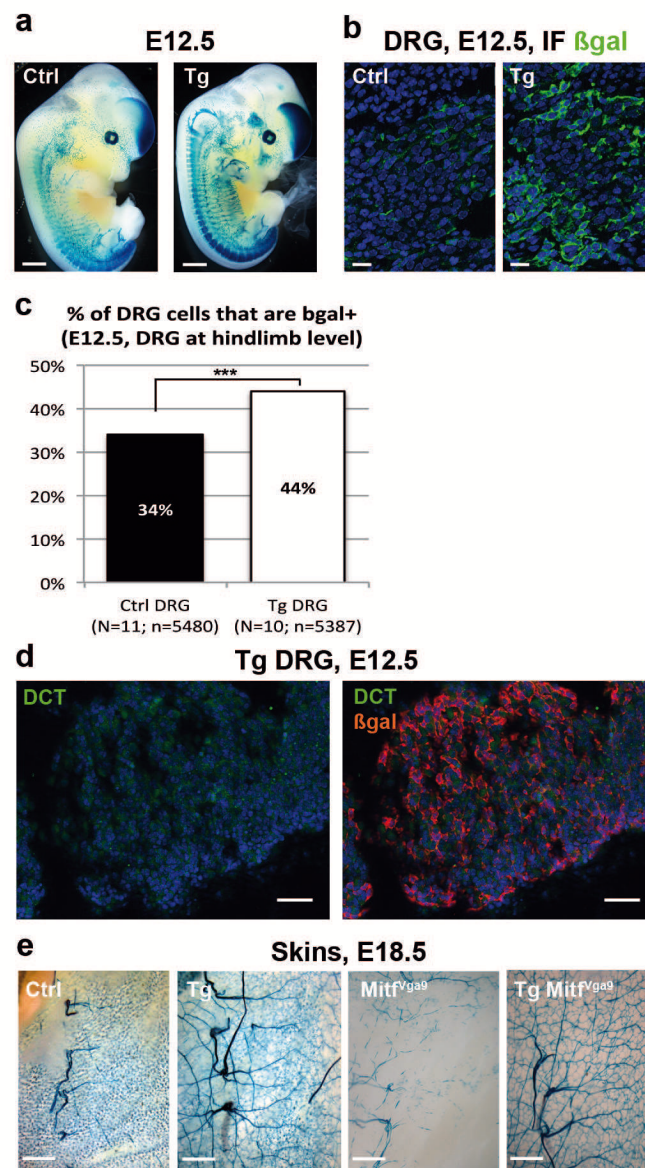


Figure 3

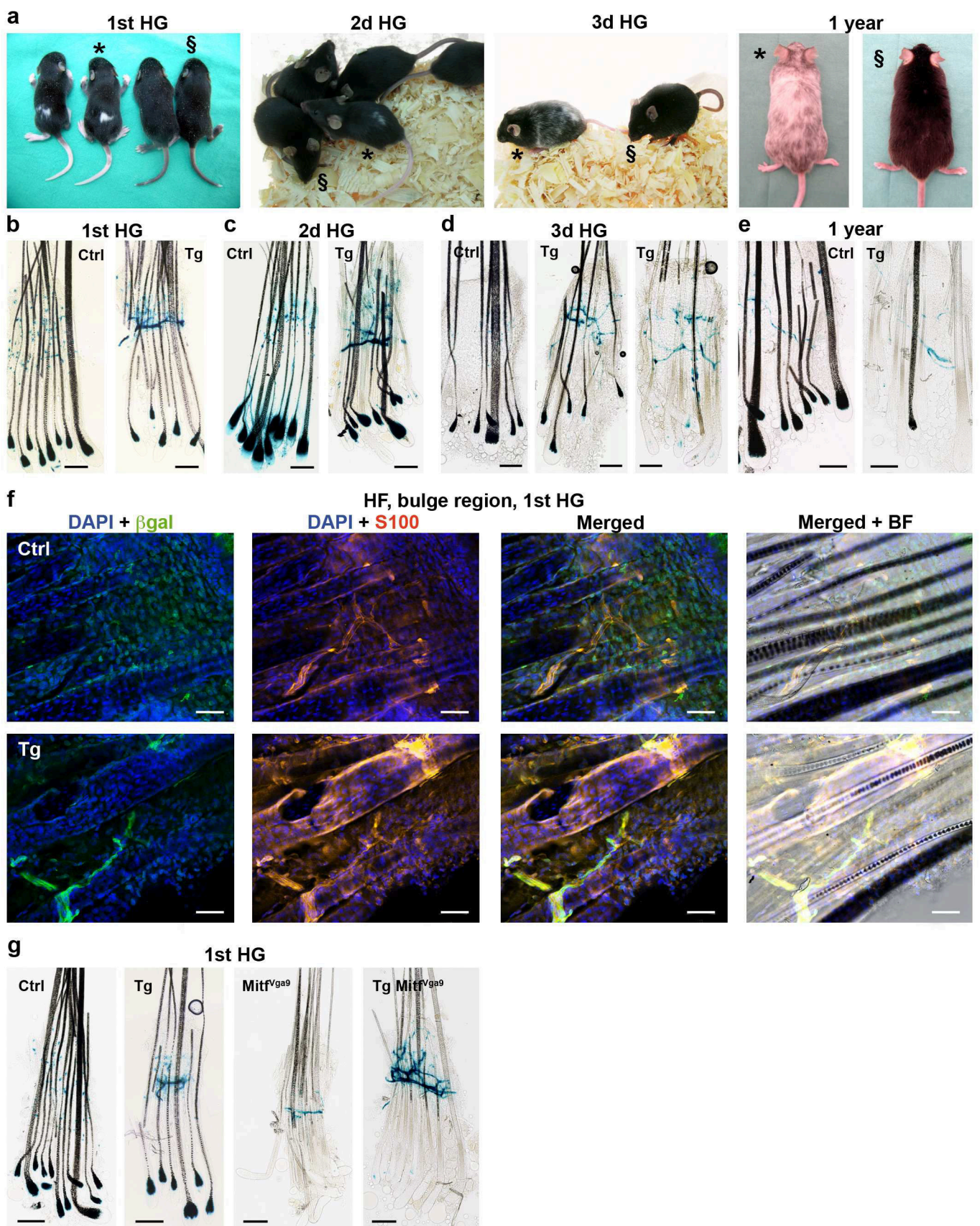


Figure 4

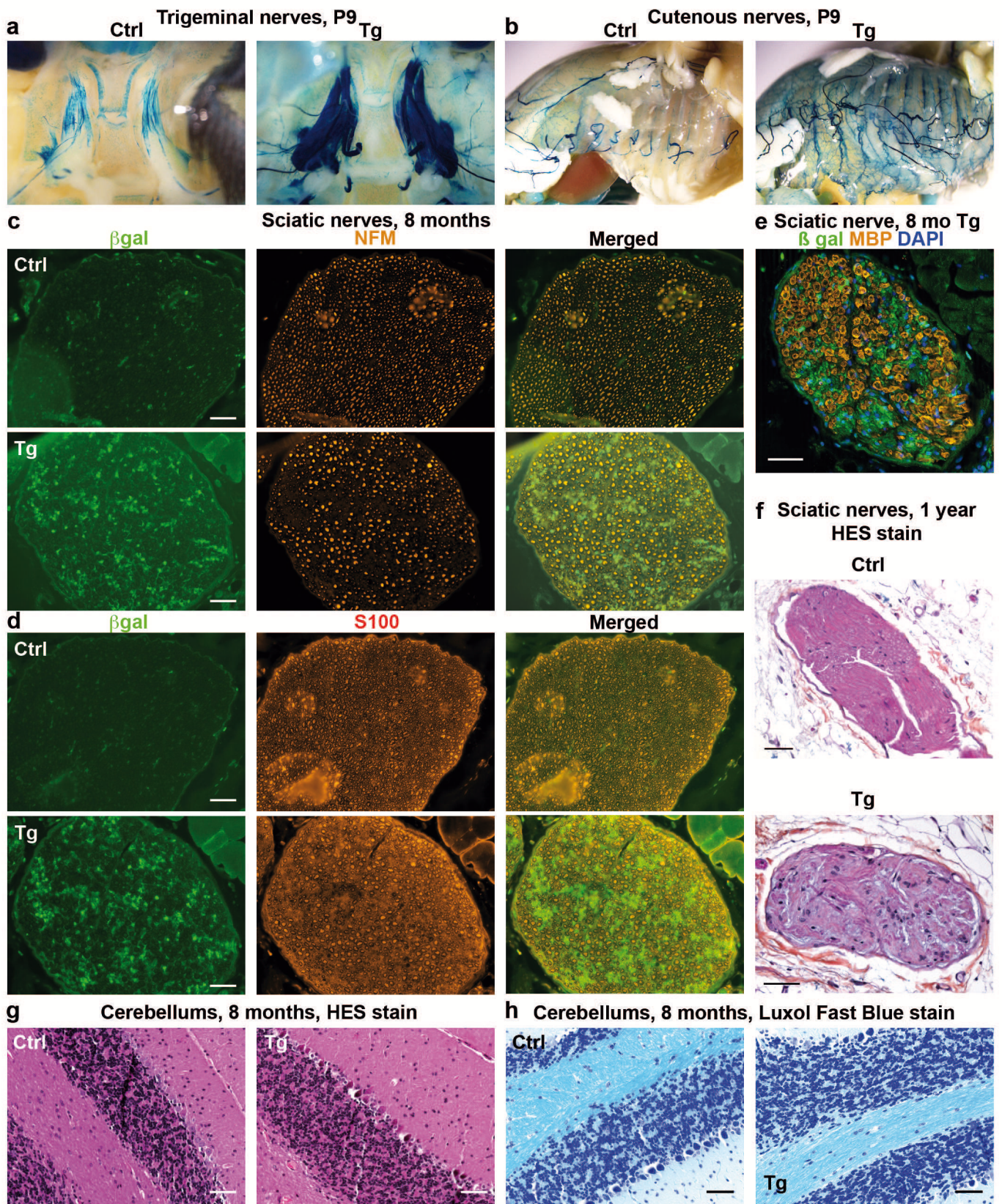
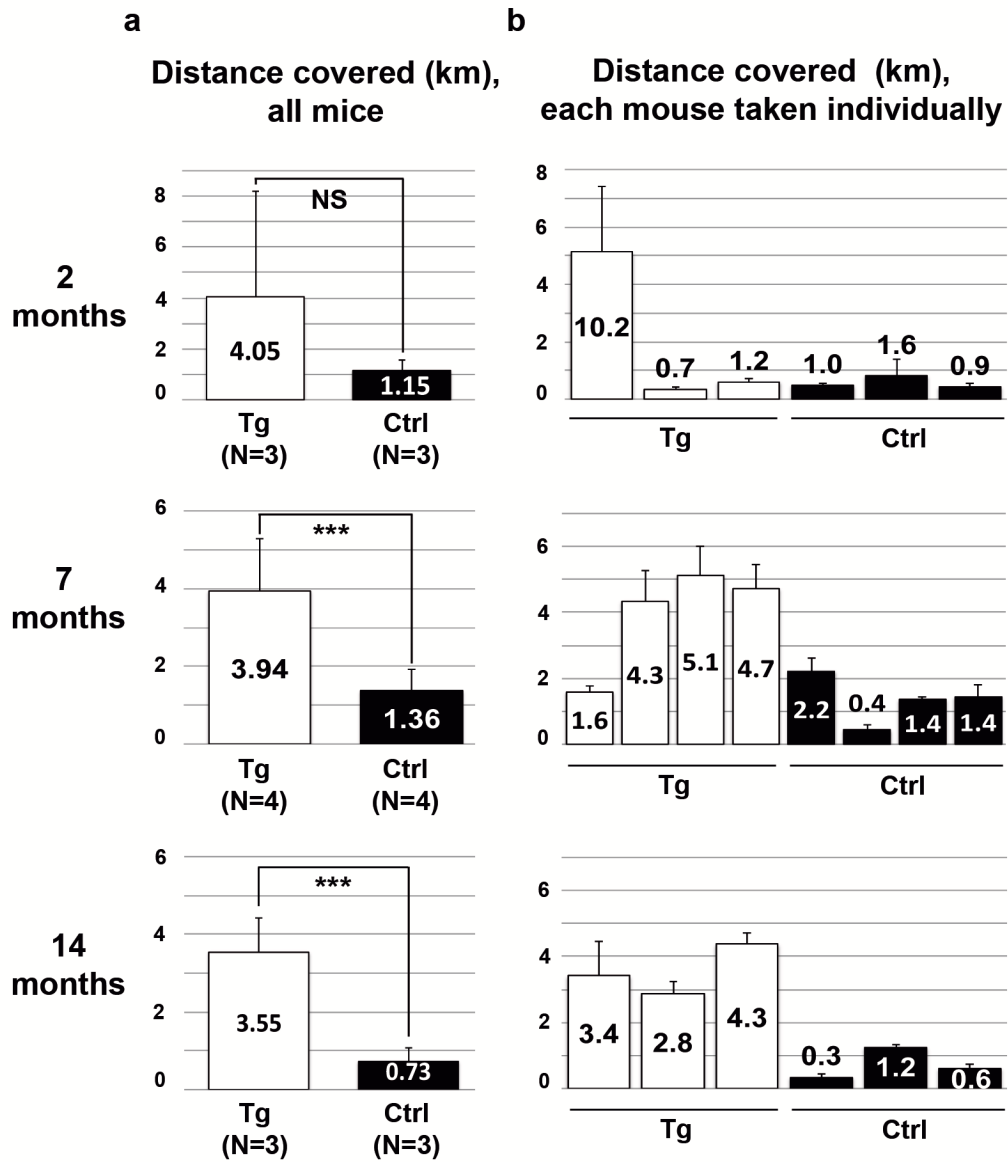


Figure 5



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary methods

Immunofluorescence

All immunostainings on DRG were performed on sections at the hindlimb level. The general protocol for double immunostainings on tissue sections was as follows: cryostat sections were rinsed in PBS. For β -galactosidase and either NFM, p75 or PAX3 double immunostainings, an antigen retrieval step was necessary (see Table S2). Blocking was performed for 1h at RT in 10% normal goat serum in PBS or according to Table S2. Sections were incubated overnight at 4°C in a solution containing both primary antibodies in PBS, washed three times for 10 min in 0.1% Tween-20 in PBS (PBST), incubated for 1h at RT in a solution containing both Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Invitrogen, France) diluted 1:500 in PBS, washed three times for 10 min in PBST then 10 min in PBS.

For double immunostainings on hair follicles (HFs), isolated HFs were fixed for 5 min in 1% PFA in PBS, rinsed three times for 20 min in PBS, blocked O/N at 4°C in 10% normal goat serum, 0.2% Triton X-100, 0.2% Tween 20 in PBS. They were incubated for 5 days at 4°C in a solution containing both primary antibodies in blocking solution, washed in PBS twice for 1h at RT then O/N at 4°C, and incubated for 5 days at 4°C in blocking solution containing both Alexa fluor conjugated secondary antibodies diluted 1:500. They were washed in PBS twice for 1h at RT then O/N at 4°C

Visualization of cell nuclei was achieved by incubating the sections, HFs or cells for 2 min in a 1:4000 DAPI solution. The sections were rinsed in PBS then mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, England).

Supplementary Table S1 : List of primary antibodies used for immunofluorescence

Antigen Isotype	Abbreviation	Host	Manufacturer (Catalog #)
Brain fatty acid binding protein IgG	bFABP	Rabbit	Thomas Müller
β -galactosidase IgG	β gal	Chicken	Abcam (ab9361)
Dopachrome tautomerase IgG	DCT/TRP2	Rabbit	Vincent Hearing (α PEP8)
Green Fluorescent Protein IgG	GFP	Chicken	Abcam (ab13970)
Myelin Basic Protein IgG2a	MBP	Rat	Millipore (MAB386)
Nestin (NS-1) IgG1		Mouse	DSHB
Neurofilament M (2H3) IgG1	NFM	Mouse	DSHB
Low affinity nerve growth factor receptor IgG	p75	Rabbit	Abcam (ab8874)
Paired-box transcription factor 3 IgG2a	PAX3	Mouse	DSHB
PGP9.5 IgG	PGP9.5	Rabbit	Abcam (ab10404)
S100 β IgG	S100	Rabbit	Dako (Z0311)
SOX10	SOX10	Goat	Santa Cruz (sc-17342)

Supplementary Table S2 : Immunostaining methods

Tissue	Primary antibodies	Dilution	Antigen retrieval method	Blocking method	Signal amplification
DRG at E12.5 or peripheral nerves in adults	βgal + BFABP	1:500 + 1:5000	-	10% NGS+ 0.1% Triton X100 in PBS for 1h at RT	-
	βgal + TRP2	1:500 + 1:500		10% NGS in PBS for 1h at RT	
	βgal + MBP	1:500 + 1:800		M.O.M blocking reagent (Vector Laboratories) for 1h at RT	
	βgal + nestin	1:500 + 1:50			
	βgal + NFM	1:500 + 1:800	Dako Target Retrieval Solution, pH 6.1, at 97°C for 30 min		
	βgal + p75	1:500 + 1:50			
	βgal + PAX3	1:500 + 1:100	Boiling solution of 10 mM Sodium Citrate Buffer, pH 6, for 7 min	10% NGS in PBS for 1h at RT	biotin + streptavidin
	βgal + PGP9.5	1:500 + 1:1000	-		
	βgal + S100	1:500 + 1:600			
	βgal + SOX10	1:500 + 1:100		0.1%Triton X100 + 0.15% Glycine + 0.1% BSA in PBS for 2h at RT	
HF at P8	βgal + NFM	1:500 + 1:800	-	10% NGS + 0.2% Triton X100 + 0.2% Tween 20 in PBS O/N at 4°C	-
	βgal + S100	1:500 + 1:10000			

Supplementary Table S3 : Expression of genes in neural crest cells and their derivatives of the neural, glial and melanocytic lineages at E12.5

Gene Name	Expression at E12.5 in			
	NCC	SCP	N	MB
nestin	+	+/-	+/-	-
PAX3	+	+	-	+
SOX10	+	+	-	+
p75	+	+	+	-
bFABP	-	+	-	-
DCT	-	-	-	+
PGP9.5	-	-	+	-
NFM	-	-	+	-
S100	-	-	-	-
MBP	-	-	-	-

NCC: neural crest cells; SCP: Schwann Cell Precursors; N: neurons; MB: melanoblasts.

This table is a compilation of data from several publications: (Ben-Zvi et al., 2007; Chacon and Boulanger, 2013; Cooper and Raible, 2009; Farinas et al., 1996; Fujita et al., 2011; Ghazvini et al., 2002; Kameda et al., 2007; Kang et al., 2007; Kioussi et al., 1995; Mirsky et al., 2008; Pavan and Raible, 2012; Sidebotham et al., 2001; Su et al., 2013; Xu et al., 2011)

Supplementary Table S4: The proportions of β -gal negative cells that are not immunolabelled with any NCC, SCP or neuron markers are lower in transgenic DRG than in control DRG at E12.5

IF against	Cell population	Tg DRG	Ctrl DRG	Chi 2 test
β gal and nestin	β gal-, nestin-	35.5% (n=6; N=746)	47.6% (n=6; N=769)	***
β gal and SOX10	β gal-, SOX10-	51.7% (n=6; N=982)	45.4% (n=6; N=1008)	**
β gal and PAX3	β gal-, PAX3-	43.4% (n=6; N=1160)	55.8% (n=6; N=1048)	***
β gal and p75	β gal-, p75-	19.9% (n=2; N=371)	38.7% (n=2; N=359)	***
β gal and bFABP	β gal-, bFABP-	25.4% (n=4; N=531)	47.5% (n=4; N=562)	***
β gal and PGP9.5	β gal-, PGP9.5-	14.6% (n=5; N=725)	24.8% (n=6; N=916)	***
β gal and NFM	β gal-, NFM-	40.5% (n=5; N=872)	67.8% (n=4; N=818)	***

Percentages are the numbers of non labelled cells relative to the total numbers of cells in the DRG. . n: number of DRG examined; N: number of cells counted. Chi 2: Chi square test : **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure S1:

(a) : RT-PCR analysis of *Sbno2* expression. PCRs were performed from reverse transcribed cDNA (+) or non reverse transcribed (-) mRNAs. Size of the amplified fragment: 304 bp. RNA used: melb-a : wild-type melanoblasts (Sviderkaya et al. 1995), melan-a : wild-type melanocytes (Bennett et al. 1987), E17.5: wild-type skin from mouse foetuses at E17.5. M : 100 bp size marker. (b): RT-qPCR analysis of *Sbno2* and *Dct* expression in a melanocyte-enriched skin cell population from *Pax3*^{GFP/+} pups at P3. Skin cell suspensions were FACS sorted on GFP expression, SYBR Green-based RT-qPCRs were performed on the sorted cells. Actin was used as endogenous reference. (c-d): β -gal expression in the skin of a *Sbno2*^{Gtl/+} embryo at E15.5 revealed by X-gal staining (dermal view). Stars : forming hair follicles. (d) is a magnification of the framed region in (c).

Supplementary Figure S2: Expression of β -galactosidase in *Tg(Dct::Sbno2)*; *Tg(Dct::lacZ)* and control embryos

Detection of β -gal activity by X-gal staining on whole mount embryos from E10.5 to E16.5 ; on whole skins at E18.5. Tg: C57BL/6J-*Tg(Dct::Sbno2)* ; *Tg(Dct::lacZ)* (transgenic). Ctrl : C57BL/6J-*Tg(Dct::lacZ)* littermate (control). Bars :.

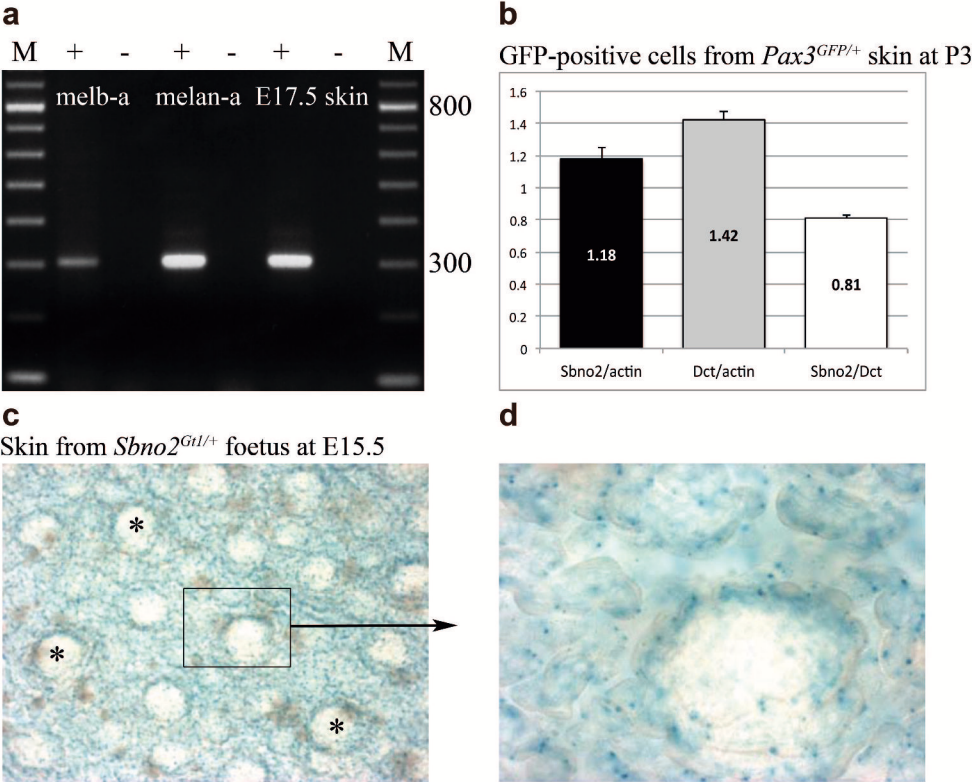
Supplementary Figure S3, S4 and S5 : Double immunostainings on sections of DRG at E12.5 and groups of hair follicles at P9

All DRG sections were chosen at the hindlimb level. Green : β -gal signal. Red : signal against the protein indicated, specific for different cell types in DRG : Figure S3 : markers of NCC : PAX3, SOX10, nestin ; Figure S4 : markers of NCC and Schwann Cells : p75, S100 (specific of iSC), MBP (specific of mSC) ; Figure S5 : markers of neurons : PGP9.5 and NFM. Merged : surperposition of both green and red images. BF : brightfield. Blue : DAPI counterstaining of nuclei. Tg: C57BL/6 - *Tg(Dct::Sbno2)* ; *Tg(Dct::lacZ)* (transgenic). Ctrl : C57BL/6J-*Tg(Dct::lacZ)* littermate (control). Bars =20 μ m except for MBP=50 μ m and NFM in HF=50 μ m.

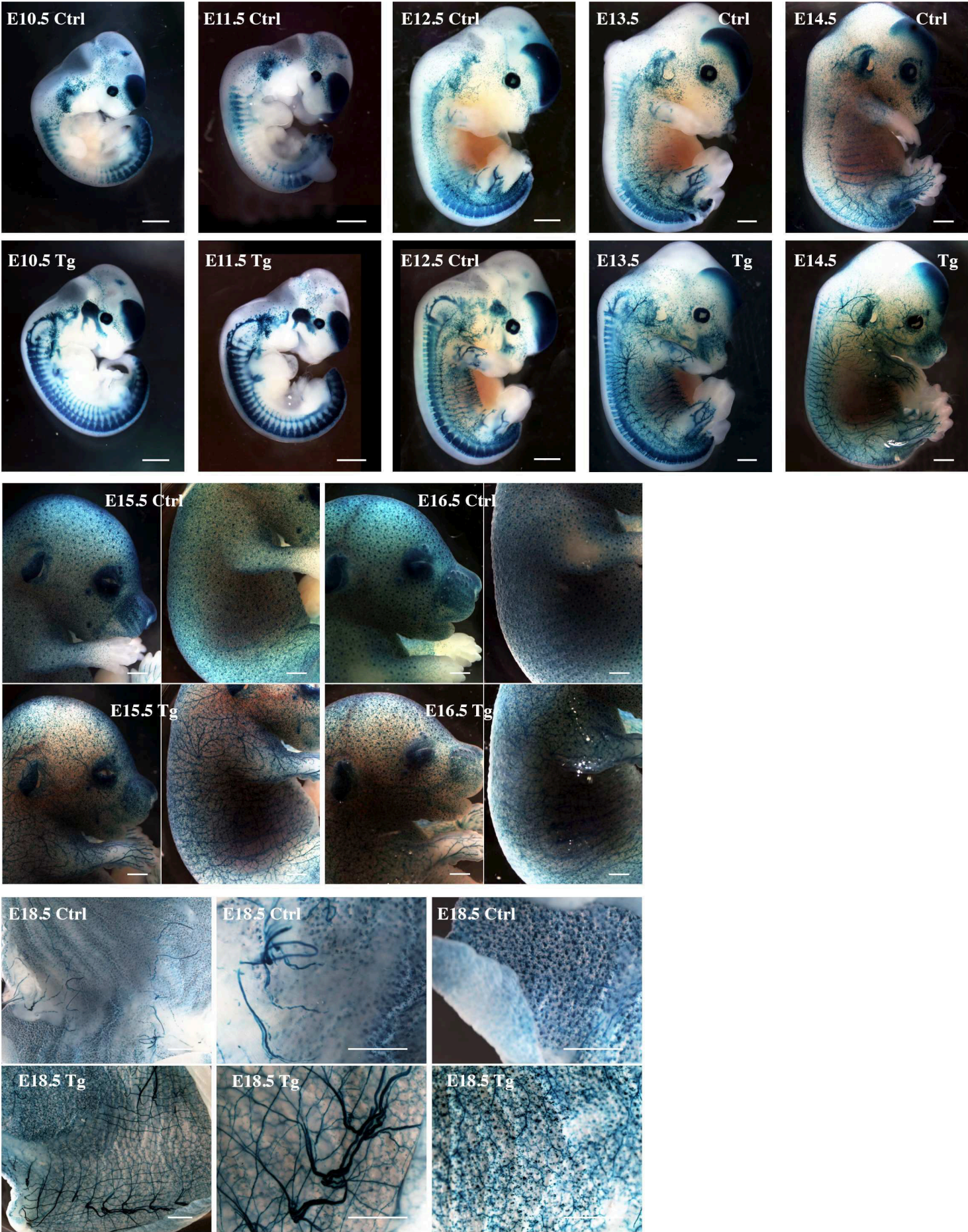
Supplementary references

- Ben-Zvi, A., Ben-Gigi, L., Klein, H., and Behar, O. (2007). Modulation of semaphorin3A activity by p75 neurotrophin receptor influences peripheral axon patterning. *J Neurosci* 27, 13000-11.
- Chacon, M. A., and Boulanger, L. M. (2013). MHC class I protein is expressed by neurons and neural progenitors in mid-gestation mouse brain. *Mol Cell Neurosci* 52, 117-27.
- Cooper, C. D., and Raible, D. W. (2009). Mechanisms for reaching the differentiated state: Insights from neural crest-derived melanocytes. *Semin Cell Dev Biol* 20, 105-10.
- Farinas, I., Yoshida, C. K., Backus, C., and Reichardt, L. F. (1996). Lack of neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors. *Neuron* 17, 1065-78.
- Fujita, K., Yasui, S., Shinohara, T., and Ito, K. (2011). Interaction between NF-kappaB signaling and Notch signaling in gliogenesis of mouse mesencephalic neural crest cells. *Mech Dev* 128, 496-509.
- Ghazvini, M., Mandemakers, W., Jaegle, M., Piirsoo, M., Driegen, S., Koutsourakis, M., Smit, X., Grosveld, F., and Meijer, D. (2002). A cell type-specific allele of the POU gene Oct-6 reveals Schwann cell autonomous function in nerve development and regeneration. *EMBO J* 21, 4612-20.
- Kameda, Y., Nishimaki, T., Chisaka, O., Iseki, S., and Sucov, H. M. (2007). Expression of the epithelial marker E-cadherin by thyroid C cells and their precursors during murine development. *J Histochem Cytochem* 55, 1075-88.
- Kang, H., Tian, L., Son, Y. J., Zuo, Y., Procaccino, D., Love, F., Hayworth, C., Trachtenberg, J., Mikesch, M., Sutton, L., et al. (2007). Regulation of the intermediate filament protein nestin at rodent neuromuscular junctions by innervation and activity. *J Neurosci* 27, 5948-57.
- Kioussi, C., Gross, M. K., and Gruss, P. (1995). Pax3: a paired domain gene as a regulator in PNS myelination. *Neuron* 15, 553-62.
- Mirsky, R., Woodhoo, A., Parkinson, D. B., Arthur-Farraj, P., Bhaskaran, A., and Jessen, K. R. (2008). Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J Peripher Nerv Syst* 13, 122-35.
- Pavan, W. J., and Raible, D. W. (2012). Specification of neural crest into sensory neuron and melanocyte lineages. *Dev Biol* 366, 55-63.
- Sidebotham, E. L., Woodward, M. N., Kenny, S. E., Lloyd, D. A., Vaillant, C. R., and Edgar, D. H. (2001). Assessment of protein gene product 9.5 as a marker of neural crest-derived precursor cells in the developing enteric nervous system. *Pediatr Surg Int* 17, 304-7.
- Su, P. H., Chen, C. C., Chang, Y. F., Wong, Z. R., Chang, K. W., Huang, B. M., and Yang, H. Y. (2013). Identification and cytoprotective function of a novel nestin isoform, Nes-S, in dorsal root ganglia neurons. *J Biol Chem* 288, 8391-404.
- Xu, Y., Xiong, F., Liu, L., and Zhang, C. (2011). Rat bone marrow stromal cells could be induced into Schwann cell precursor-like cells in vitro. *Neurosci Lett* 488, 229-33.

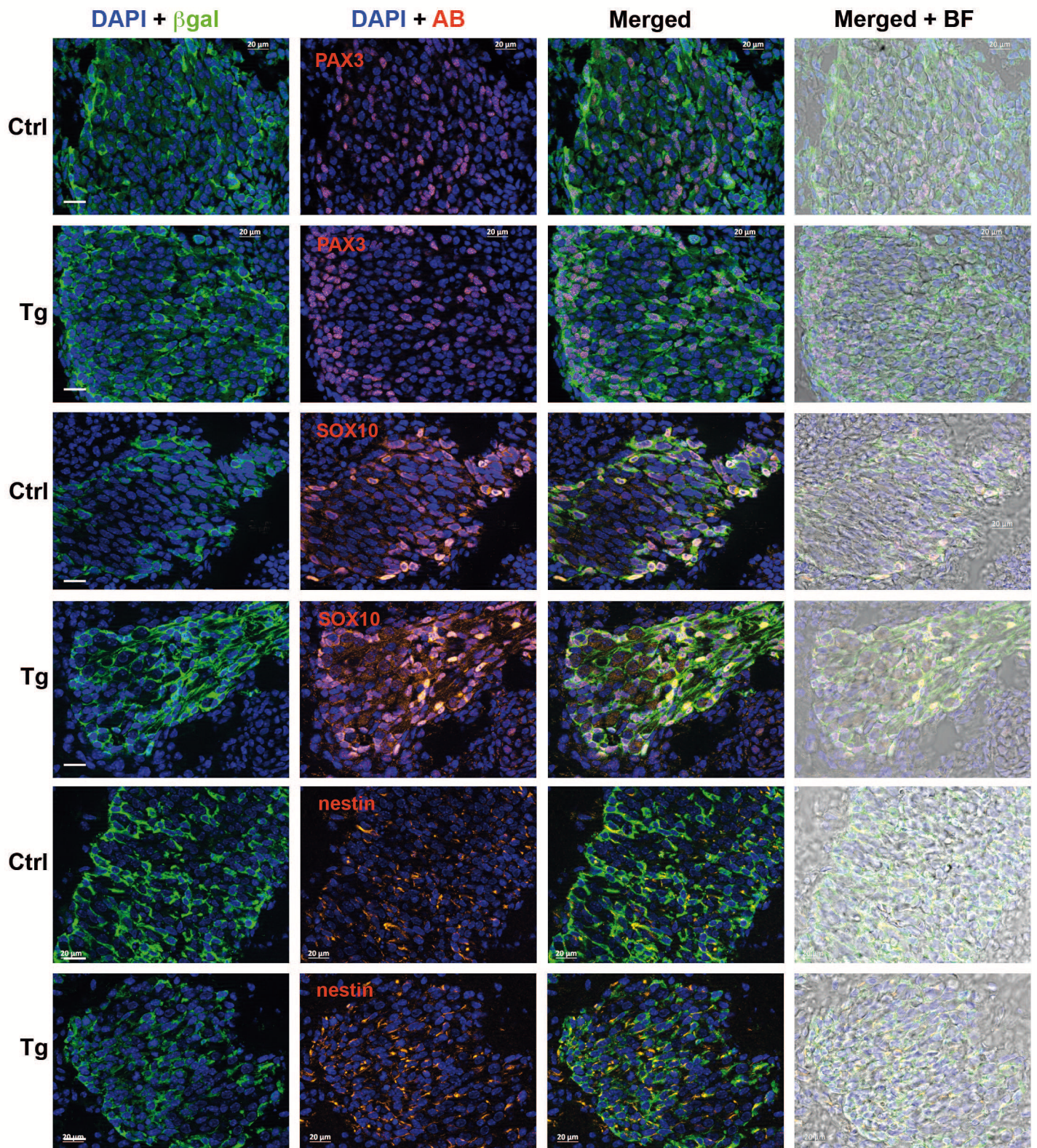
Supplementary Figure S1



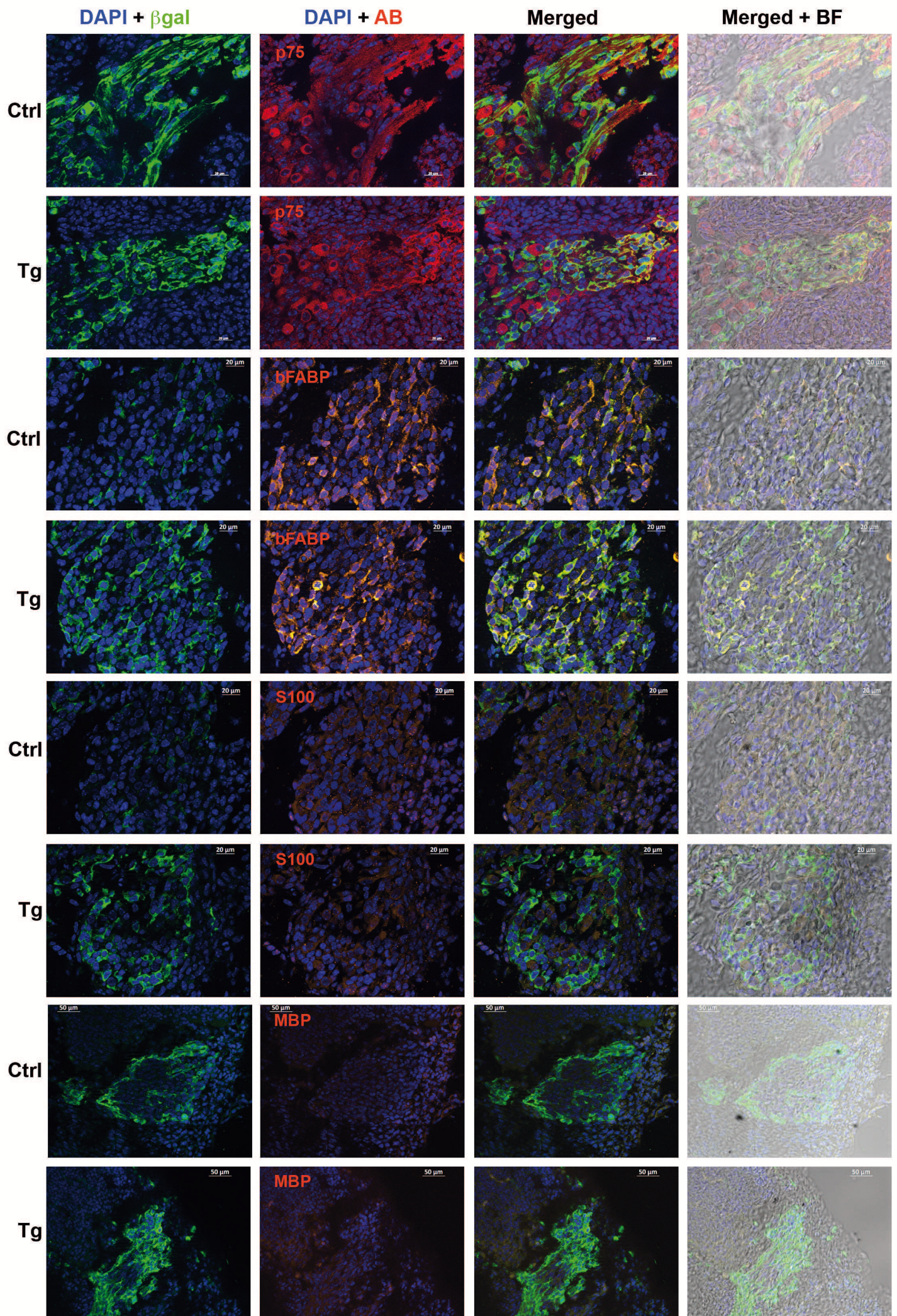
Supplementary Figure S2



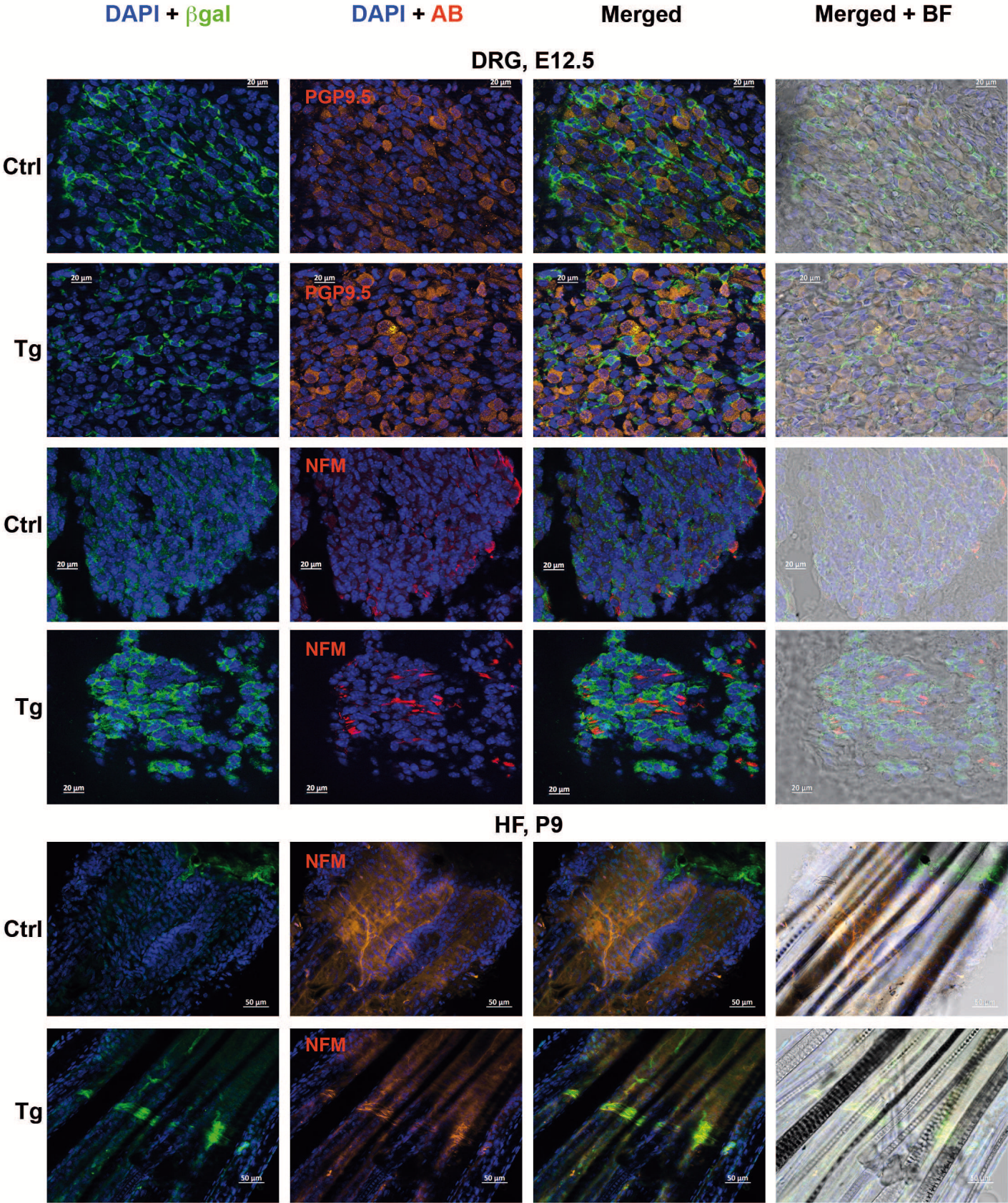
Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S4



Supplementary Figure S5



C - Discussion

1) Validation de la lignée *Tg(Dct::Sbno2)*

La lignée *Tg(Dct::Sbno2)* présente des phénotypes tout à fait singuliers. Cependant, nous avons rencontré plusieurs difficultés d'ordre technique dans sa validation formelle.

La lignée décrite dans l'article en préparation est la seule qui présentait un phénotype de pelage parmi les 11 produites et surexprimant *Sbno2* dans la peau. De plus, cette lignée n'est pas celle dans laquelle le niveau de surexpression du gène était le plus élevé. Il est donc possible que le phénotype de cette lignée soit dû à un effet de position et non pas à la surexpression de *Sbno2 per se*. Nous avons tenté sans succès de cloner le site d'insertion du transgène par PCR inverse et ne pouvons pas formellement écarter cette hypothèse. Cependant, les souris *Tg(Dct::Sbno2)* ont un phénotype rouan associant poils noirs et blancs sans aucun poil gris, tout comme la mutation patchwork. Il est fort peu probable que nous ayons réussi par hasard à reproduire un phénotype qui n'a été décrit qu'une fois dans toute la littérature des gènes de coloration chez la souris.

Nous avons montré par RT-qPCR que *Sbno2* est exprimé dans la peau embryonnaire, dans des populations cellulaires de peau enrichies en mélanocytes juste après la naissance, et dans les mélanoblastes et mélanocytes en culture. Cependant, nous n'avons pas pu confirmer ces résultats par des expériences *in situ*. D'une part, nous n'avons pas trouvé d'anticorps anti SBNO2 qui fonctionne sur coupes histologiques de peau, soit congelées, soit en paraffine. Les anticorps commerciaux sont peu nombreux, et la plupart d'entre eux sont dirigés contre des épitopes communs à SBNO2 et à son homologue SBNO1, alors que les deux protéines sont exprimées dans la peau. Nous avons travaillé à la mise au point de deux anticorps commerciaux permettant de discriminer SBNO2 de SBNO11, produits par Santa Cruz, SBNO2 (K-15) et SBNO2 (N-14). Malgré beaucoup de temps de mise au point, nous n'avons pas réussi à obtenir un signal au-dessus du bruit de fond. Nous avons également fait produire deux anticorps dirigés contre deux peptides N-terminaux de SBNO2 mais n'avons là non plus pas réussi à obtenir un signal spécifique. Quant aux hybridations *in situ*, si elles fonctionnent bien chez l'embryon jusqu'à E11,5 (Figure 50), aucun signal n'est obtenu avec des stades embryonnaires plus tardifs ni en période postnatale. Nous pensons que le niveau d'expression de *Sbno2* et de sa protéine est trop faible pour être détectable respectivement en hybridation *in situ* et en immunohistochimie ou immunofluorescence sur coupes histologiques.

Nous avons alors voulu tirer parti de l'allèle *Sbno2^{Gt1}* qui avait été produit au laboratoire. Cet allèle nul de *Sbno2* comporte le gène rapporteur *lacZ* et aurait dû nous permettre de visualiser les cellules exprimant *Sbno2 in situ*. Sur le fonds génétique initial 129/Ola (celui des cellules ES XN464 porteuses du vecteur gene trap inséré dans *Sbno2*), le gène rapporteur s'exprimait bien et nous a effectivement permis de montrer que le patron d'expression de SBNO2 dans la peau embryonnaire était bien plus large que celui du lignage mélanocytaire (cf Figure S1, c et d et le premier paragraphe

des résultats de l'article en préparation). Pour pouvoir utiliser l'allèle *Sbno2*^{Gt1} dans nos expériences, nous l'avons transféré sur le fonds génétique C57BL/6 afin de garder un fonds génétique homogène avec celui de la lignée *Tg(Dct::Sbno2)*. Au bout de 4 générations de croisements en retour sur C57BL/6, le gène rapporteur a cessé de s'exprimer. Nous n'avons donc à ce jour aucun moyen de visualiser les cellules exprimant *Sbno2 in situ*.

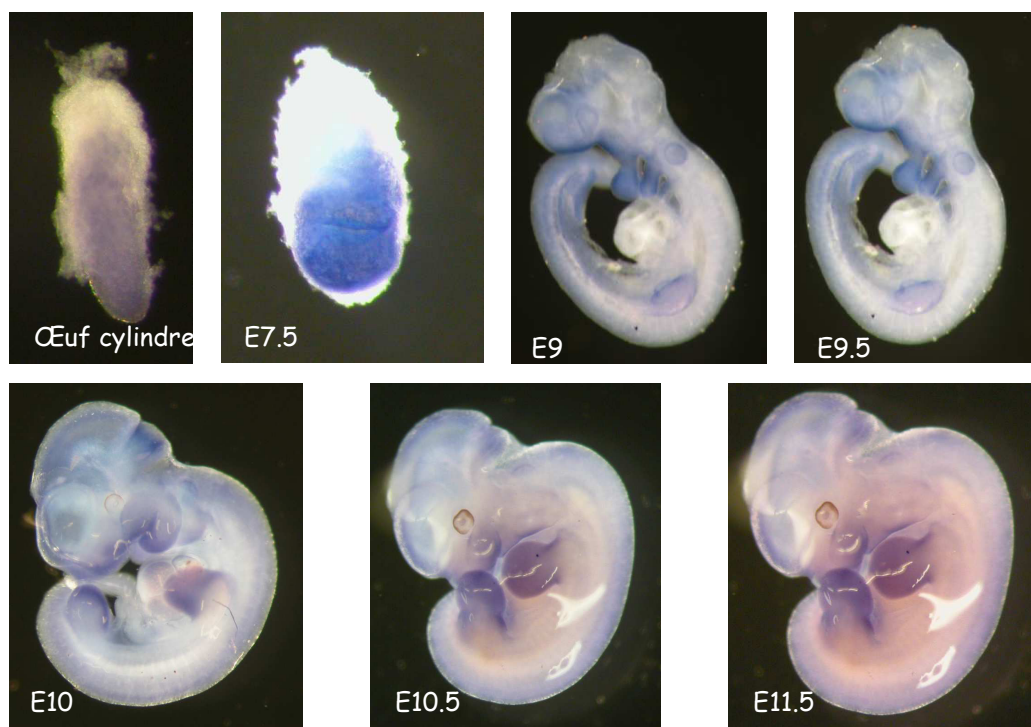


Figure 50 : Expression de *Sbno2* révélée par hybridation *in situ*

L'expression de *Sbno2*, révélée au BM *purple*, apparaît en violet (Aubin-Houzelstein *et al.*, non publié).

Le taux de surexpression de *Sbno2* dans les mélanoblastes des fœtus *Tg(Dct::Sbno2)* à E17,5 est modéré. Si l'on considère la peau totale, l'expression de *Sbno2* relative au gène de ménage *Gapdh* est équivalente dans les peaux transgéniques et témoins. Cependant, nous avons montré 1) qu'au moins un autre type cellulaire que les mélanoblastes expriment *Sbno2*, et 2) que la densité, et donc le nombre total, de mélanoblastes est réduite dans la peau des fœtus transgéniques par rapport aux témoins (Figure 2e, Figure S2). Donc 1) la surexpression de *Sbno2* dans les mélanoblastes *Tg(Dct::Sbno2)* est partiellement masquée par l'expression « bruit de fond » dans le reste de la peau, non affectée par le transgène ; 2) si l'on considère que l'expression de *Dct* est proportionnelle au nombre de mélanoblastes de la peau, l'expression de *Sbno2* relative à *Dct* permet de mieux rendre compte de l'expression de *Sbno2* par mélanoblaste ; on la trouve deux fois plus élevée dans les peaux de fœtus *Tg(Dct::Sbno2)* que de témoins à E17,5 (Figure 1c). De façon intéressante, ce facteur 2 est retrouvé dans la peau des fœtus patchwork à E17,5 comparée à celle des témoins (Aubin-Houzelstein *et al.*, non publié).

Pour pouvoir repérer facilement les cellules du lignage mélanocytaire chez les souris *Tg(Dct::Sbno2)*, nous les avons croisées avec les souris *Tg(Dct::lacZ)* puis avons effectué des colorations

X-gal et des immunofluorescences avec un anticorps anti-βgal. Ce faisant, nous avons pu introduire un biais dans nos expériences. Les promoteurs des deux transgènes étant les mêmes et SBNO2 étant un facteur de transcription, il serait possible qu'il puisse activer sa propre expression et celle du gène *lacZ* dans notre système. L'intense marquage X-gal des DRG et des nerfs périphériques obtenue dans la lignée *Tg(Dct::Sbno2); Tg(Dct::lacZ)* serait donc dû à l'emploi du même promoteur pour les deux transgènes.

Pour s'affranchir de ce problème éventuel, nous avons voulu produire des transgéniques *Tg(Tyr::Sbno2)*, en utilisant le promoteur *Tyrosinase* que l'équipe de Lionel Larue avait utilisé pour la production de sa lignée *Tg(Tyr::Cre)* (Delmas *et al.*, 2003). Ce promoteur est connu pour donner un fort niveau d'expression de l'ADNc placé en aval dans des souris transgéniques. La construction a été injectée dans des embryons au stade une cellule, des naissances ont été obtenues mais il n'y avait aucun souriceau transgénique dans les portées.

Parallèlement, nous avons cherché à repérer le lignage mélanocytaire à l'aide d'un autre système rapporteur que le transgène *Tg(Dct::lacZ)*. Nous avons ainsi produit des embryons *Tg(Tyr::Cre); Rosa26^{lacZ/+}; Tg(Dct::Sbno2)* et les avons colorés en X-gal. *Rosa26* est un gène à expression forte et ubiquitaire. L'allèle *Rosa26^{lacZ}* comporte le gène *lacZ* flanqué de deux sites *loxP*, permettant l'expression en phase du rapporteur *lacZ* sous l'action de la recombinaison Cre (Soriano, 1999). Nous avons coloré des embryons à E12,5 mais avons obtenu des patrons d'expression de la β-gal très variables d'un individu à l'autre, et ne correspondant pas à celui attendu pour la tyrosinase, même chez les témoins *Tg(Tyr::Cre); Rosa26^{lacZ/+}*. Nous n'avons donc pas poursuivi plus avant l'emploi de ce système rapporteur du lignage mélanocytaire.

Malgré toutes ces limites, les souris *Tg(Dct::Sbno2)* présentent un phénotype tellement particulier qu'il nous a semblé pertinent de l'étudier.

❖ **Phénotype de pelage des souris *Tg(Dct::Sbno2)***

Sur le fonds génétique initial (C57BL/6J x CBA/J), les souris transgéniques reproduisent le phénotype patchwork : juxtaposition de poils de couleur sauvage, et de poils blancs, sans aucun poil gris. Ce résultat suggère fortement que la surexpression de *Sbno2* dans le lignage mélanocytaire suffit pour obtenir le phénotype patchwork.

Les souris congéniques C57BL/6J- *Tg(Dct::Sbno2)* ont un phénotype différent : les souriceaux ont un pelage sauvage, hormis le bout des pattes et de la queue blanc, une large tache blanche sur le ventre, et de façon non obligatoire, des taches blanches sur le dos. Les zones blanches sont dépourvues de mélanocytes. La différence de phénotype en fonction du fonds génétique est fréquente avec les mutations de pelage. D'ailleurs, la mutation patchwork, si elle s'exprime bien sur fonds agouti, est perdue sur fonds non agouti. Nous avons ainsi essayé de la transférer sur fonds C57BL/6J et au bout de

quelques générations de croisements en retour, toutes les souris homozygotes patchwork étaient noires. La pénétrance de patchwork sur le fonds C57BL/6J est donc très mauvaise.

Le phénotype des souris congéniques C57BL/6J- *Tg(Dct::Sbno2)* est caractéristique des mutations affectant le développement du lignage mélanocytaire pendant l'embryogenèse, le ventre, le bout des pattes et de la queue étant les zones de fin de migration des mélanoblastes. En effet, toute mutation affectant la détermination, la survie, la prolifération ou la migration des mélanoblastes conduit à l'absence de mélanocytes dans ces zones distales, de fin de migration, qui sont blanches (Hornyak, 2006). De fait, les coloration X-gal in toto d'embryons C57BL/6J- *Tg(Dct::Sbno2)* ; *Tg(Dct::lacZ)* et témoins frères de portée C57BL/6J- *Tg(Dct::lacZ)* ont permis de montrer que la densité de mélanoblastes à la surface de la peau était fortement réduite chez les transgéniques (Figure 2a, Figure S2 de l'article en préparation). L'expansion des mélanoblastes est donc affectée chez les transgéniques.

De façon inattendue, les souris congéniques C57BL/6J- *Tg(Dct::Sbno2)* blanchissent prématurément, suggérant un défaut dans les CSM. Contrairement à la plupart des autres mutations affectant le maintien des CSM, le blanchiment n'est jamais total. Même chez les transgéniques âgées, il reste dans certains follicules pileux des CSM capables de donner des mélanocytes différenciés. De façon intéressante, chez les transgéniques âgées, on ne trouve que des poils noirs et des poils blancs, sans aucun poil gris : dans les follicules pileux où il reste des cellules souches, elles sont capables de donner le nombre minimum de mélanocytes différenciés nécessaire à l'obtention d'une couleur de poil sauvage. Nous avons utilisé le rapporteur *Tg(Dct::lacZ)* pour étudier la distribution des cellules du lignage mélanocytaire dans les follicules pileux transgéniques et témoins et avons confirmé la densité moindre chez les transgéniques.

Cependant, la diminution de densité de mélanoblastes embryonnaires et de cellules mélanocytaires en période postnatale a été difficile à étudier du fait de l'intense marquage X-gal dans les DRG chez l'embryon et dans les nerfs cutanés en période postnatale (Figure 2a et Figure S2 ; Figure 3, b à e). En particulier, nous n'avons pas pu procéder à des comptages des cellules du lignage mélanocytaire chez les transgéniques. Nous nous sommes alors intéressés à ce phénotype absolument unique.

❖ Expression de la β -galactosidase dans les structures nerveuses périphériques des souris C57BL/6J- *Tg(Dct::Sbno2)*

Chez les embryons transgéniques, la β -gal est exprimée dans les DRG, les noyaux de certains nerfs crâniens, notamment les trijumeaux, dans les nerfs spinaux et les nerfs cutanés. Après la naissance, elle est exprimée dans les nerfs périphériques, en particulier dans les nerfs cutanés.

Les données d'immunomarquages dirigés contre la β -gal sur DRG à E12,5 montrent que l'augmentation du marquage β -gal chez les transgéniques est lié à la fois à une intensité de marquage par cellule qui semble plus forte, même si nous n'avons pas pu la mesurer formellement, mais aussi à

un plus grand nombre de cellules marquées (Figure 2, b à d de l'article en préparation) chez les transgéniques que chez les témoins. Il y aurait donc à la fois augmentation de l'expression par cellule et extension du domaine d'expression, donc expression ectopique, du rapporteur *lacZ*.

L'expression ectopique de la β -gal est indépendante de la présence de cellules pigmentaires (Figure 2e et Figure 3g). On peut donc exclure le fait que la surexpression de *Sbno2* dans les mélanoblastes embryonnaires, et les CSM ou les cellules progénitrices en période postnatale, puisse entraîner un changement de destinée, au détriment des mélanocytes vers les neurones ou les cellules de Schwann.

Chez les transgéniques, les cellules des structures nerveuses périphériques exprimant la β -gal ne sont pas marquées avec l'anticorps anti DCT. Ceci prouve qu'il ne s'agit pas de cellules du lignage mélanocytaire ectopiques. De plus, un certain marquage des DRG rostraux et caudaux et dans les nerfs spinaux caudaux existe chez les témoins *Tg(Dct::lacZ)* (Figure 2a et Figure S2 de l'article en préparation). Il est probable qu'il manque des séquences régulatrices dans le promoteur minimal *Dct* utilisé dans les constructions *Dct::Sbno2* et *Dct::lacZ*, permettant l'expression de la β -gal dans certaines structures nerveuses périphériques.

❖ Nature des cellules β -galactosidase positives dans les structures nerveuses périphériques des souris C57BL/6J- *Tg(Dct::Sbno2)*

Nous avons étudié l'expression de différents marqueurs sur coupes de DRG à E12,5, toujours prises au niveau des membres postérieurs, là où la β -gal est exprimée à la fois chez les mutants et les témoins. A l'aide d'immunomarquages, nous avons montré que les cellules β -gal positives des DRG à E12,5 expriment des marqueurs de cellules multipotentes dérivées des CN et de PCS, mais que très peu expriment des marqueurs de neurones, chez les transgéniques comme chez les témoins (Figures S3 à S5). Cela laisse penser qu'il s'agit de cellules multipotentes dérivées des CN et de PCS.

La proportion de cellules β -gal positives exprimant les marqueurs SOX10, PAX3, p75, bFABP et PGP9.5 était supérieure chez les transgéniques que chez les témoins (Tableau 1). En considérant l'ensemble des cellules, qu'elles soient β -gal positives ou négatives, le même résultat a été trouvé (Tableau 2). La proportion de cellules n'exprimant aucun des marqueurs de cellules de crête neurale, de PCS ou de neurones était plus faible dans les DRG transgéniques (Tableau 3).

L'ensemble de ces résultats suggère que chez les transgéniques, il y aurait plus de cellules multipotentes dérivées des CN, qui pourraient à leur tour donner plus de cellules de destinée gliale et de neurones.

En période postnatale, nous avons étudié la structure et l'expression de marqueurs de lignage sur des coupes de nerfs sciatiques de souris C57BL/6J- *Tg(Dct::Sbno2)* ; *Tg(Dct::lacZ)* et témoins frères de portée C57BL/6J- *Tg(Dct::lacZ)*. Les cellules β -gal positives étaient beaucoup plus nombreuses, et à

marquage beaucoup plus intense dans les nerfs de transgéniques. Nous avons trouvé que les cellules β -gal positives n'exprimaient ni NFM ni MBP, des marqueurs exprimés par les axones et les cellules de Schwann myélinisées. Chez les transgéniques, une faible proportion de cellules β -gal positives étaient immunoréactives pour S100 β , une protéine exprimée par les cellules de Schwann non myélinisées dans les nerfs. La majorité des cellules β -gal positives n'étaient pas marquées ni pour NFM, ni pour MBP, ni pour S100 β . Leur position dans le nerf et leur morphologie laissent à penser qu'il s'agit de fibroblastes endoneuraux (Figure 51). De façon intéressante, les fibroblastes endoneuraux sont des dérivés des CN, déterminés à partir de cellules souches de CN (NCSC) présentes dans les nerfs périphériques, capables de donner des neurones, des cellules de Schwann et des fibroblastes (Joseph *et al.*, 2004) (Figure 52).

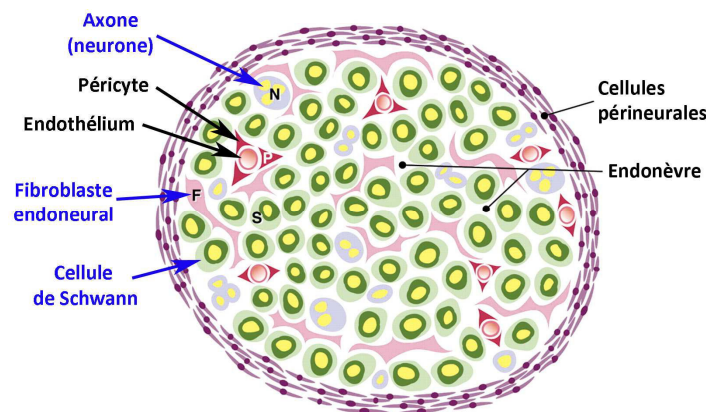


Figure 51 : Types cellulaires dérivés des CN dans un nerf périphérique
Les cellules en bleu dérivent des crêtes neurales (d'après (Joseph *et al.*, 2004)).

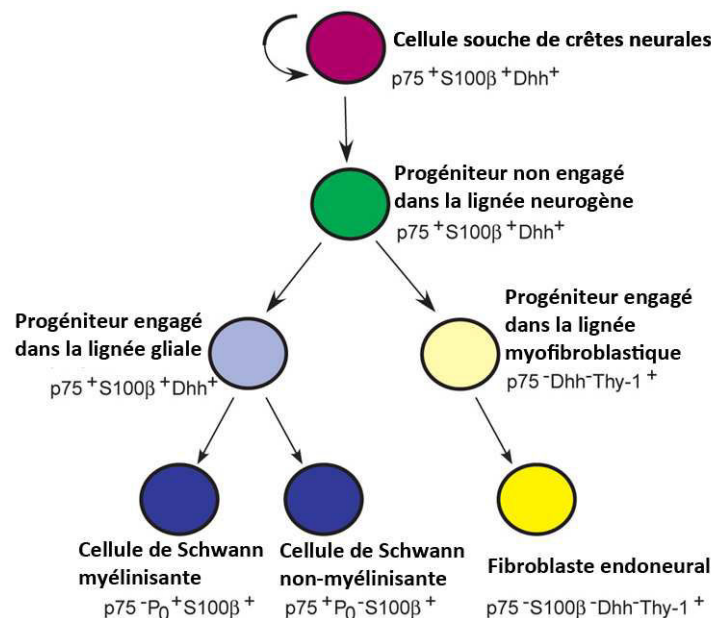


Figure 52 : Modèle de développement des nerfs périphériques

Les NCSC sont capables d'auto-renouvellement, et de restriction de potentiel sous l'influence de NrgA, Delta et Bmp4. Le progéniteur qui en résulte a perdu le potentiel neuronal, et forme des progéniteurs gliaux et de myofibroblastes. Ces derniers se différencient pour donner des fibroblastes endoneuraux (Joseph *et al.*, 2004).

Dans les nerfs de souris C57BL/6J- *Tg(Dct::Sbno2)* ; *Tg(Dct::lacZ)*, nous avons observé qu'il y avait moins d'axones, β -gal négatifs, mais plus de fibroblastes endoneuraux, β -gal positifs, que chez les témoins. Les axones présents étaient myélinisés. Nous émettons l'hypothèse que ce phénotype résulte de la surexpression de SBNO2 dans les NCSC, favorisant la destinée fibroblaste endoneural au détriment de la destinée neuronale, et cellule de Schwann. Cependant, nous n'avons pas testé formellement cette hypothèse.

❖ Lésions nerveuses et phénotype neurologique chez les souris C57BL/6J- *Tg(Dct::Sbno2)*

Les changements cellulaires observés dans les structures nerveuses périphériques des souris transgéniques nous ont conduits à étudier s'il n'y avait pas un phénotype neurologique associé.

Histologiquement, les nerfs transgéniques présentaient une perte de neurone et une fibrose endoneurale (Figure 4). D'un point de vue clinique, les souris transgéniques présentaient une hyperactivité locomotrice spontanée, d'apparition plus ou moins précoce selon les souris, mais évolutive, de telle sorte que toutes les transgéniques étudiées étaient hyperactives à 14 mois (Figure 5 et Tableau 3).

Le transgène *Dct::lacZ* est exprimé dans l'encéphale. L'hyperactivité des souris *Tg(Dct::Sbno2)* pourrait provoquer des lésions de l'encéphale liée à la surexpression de *Sbno2*. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié des coupes histologiques d'encéphales de souris *Tg(Dct::Sbno2)* et témoins. Aucune lésion significative n'a été mise en évidence.

Nous avons recherché si le phénotype neurologique des souris *Tg(Dct::Sbno2)* avait une composante neuromusculaire. En collaboration avec le service de neurologie de l'ENVA, nous avons effectué des électromyogrammes sur des souris *Tg(Dct::Sbno2)* et des souris témoins (2 animaux par groupe). Il n'a pas été observé d'anomalies significatives hormis la mesure d'une discrète activité spontanée chez les transgéniques.

L'ensemble de ces résultats permet d'affirmer que les souris transgéniques ont un phénotype neurologique, mais à l'heure actuelle, nous ne pouvons pas affirmer s'il est d'origine centrale ou périphérique.

❖ Hypothèse de mode d'action de la surexpression de SBNO2 chez les souris C57BL/6J- *Tg(Dct::Sbno2)* ; *Tg(Dct::lacZ)*

Les types cellulaires atteints chez les transgéniques, à savoir les mélanocytes, les cellules de Schwann et/ou les neurones, dérivent tous de cellules de crête neurale. Au cours du développement, les cellules de crête neurale subissent des restrictions de potentialité en fonction de facteurs intrinsèques et extrinsèques. En particulier, dans les cellules de crête neurale tronculaire, les destinées mélanocytaire et gliale font intervenir l'expression mutuellement exclusive des facteurs de transcription

FOXD3 et MITF (Figure 53) (Ernfors, 2010). Des résultats préliminaires montrent que FOXD3 est surexprimé dans les DRG et les nerfs spinaux des embryons transgéniques (Figure 54). En activant l'expression de *Foxd3*, SBNO2 favoriserait la destinée gliale au détriment de la destinée mélanocytaire (Figure 55).

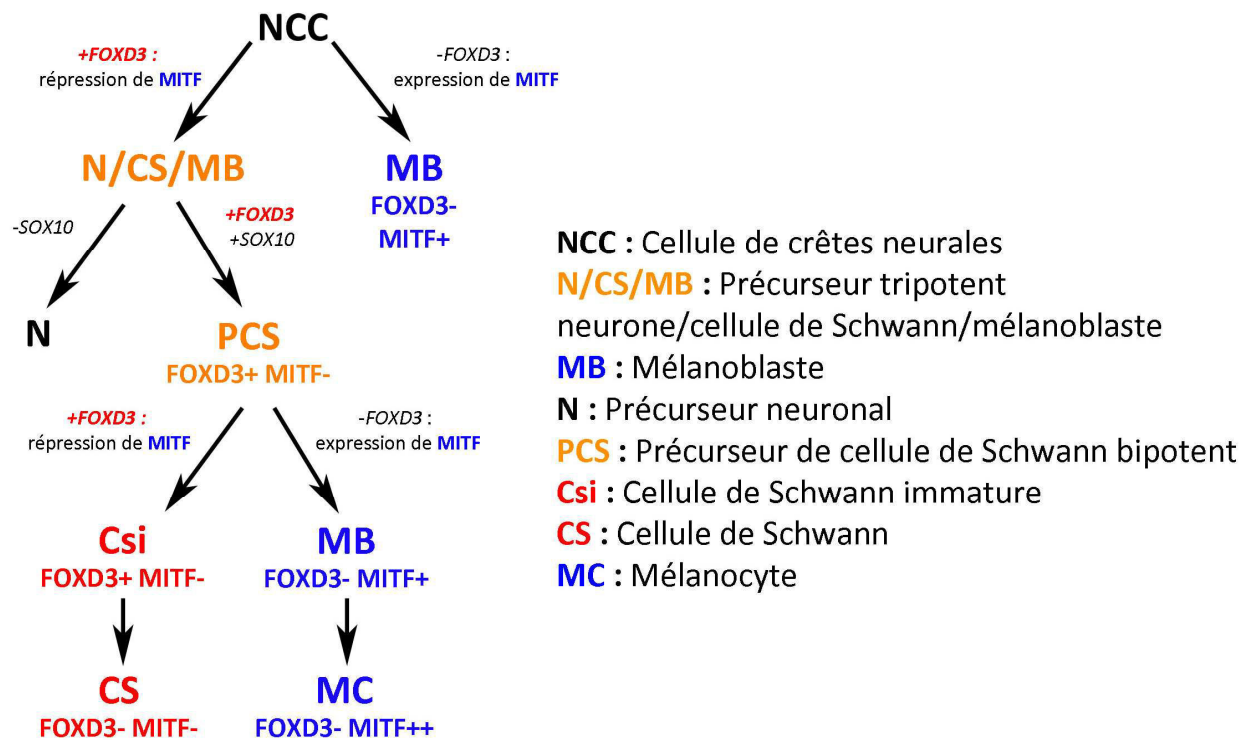


Figure 53 : Spécification des neurones, cellules de Schwann et mélanocytes depuis les CCN troncales
Antagonisme entre Foxd3 et MITF (Modifié de Ernfors, 2010).

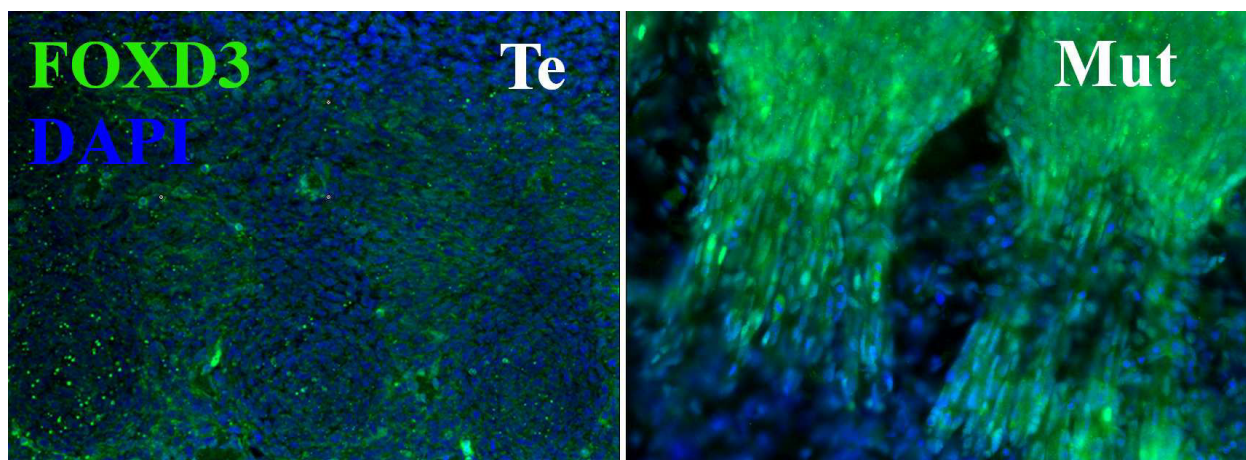


Figure 54 : Immunofluorescence anti-FOXD3 sur DRG d'embryons E12,5
Le signal FOXD3 est en vert. L'embryon témoin est à gauche et l'embryon mutant à droite.

Nous formulons l'hypothèse que les phénotypes pigmentaires et neurologiques des transgéniques ont une origine commune : un défaut du programme de différenciation de cellules multipotentes dérivées des CN.

Pour tester cette hypothèse, nous pouvons proposer le schéma expérimental résumé en Figure 56. Pour rechercher les gènes cibles de SBNO2, nous disséquons l'ensemble des DRG d'embryons SBNO2 et témoins à E13,5 et E16,5 et préparons des suspensions cellulaires selon la méthode de Li et ses collaborateurs (Li *et al.*, 2007). Nous préparons leurs ARN messagers et nous comparons les niveaux d'expression entre les deux groupes pour les gènes :

- *Sbno2* afin de vérifier que la mutation SBNO2 entraîne bien la surexpression de *Sbno2* ;
- *Dct* pour tester si *Dct* est une cible transcriptionnelle de SBNO2. Chez les souris *Tg(Dct::Sbno2)* ; *Tg(Dct::lacZ)*, le même promoteur *Dct* conduit l'expression des ADNc *Sbno2* et *lacZ* et la surexpression de la β -gal observée pourrait être due à la surexpression de DCT par SBNO2 .
- *Foxd3* pour valider l'hypothèse de surexpression de *Foxd3* par SBNO2. Dans le même but, nous effectuerons des doubles immunomarquages anti-FOXD3 et anti- β gal sur coupes d'embryons SBNO2 ; *Tg(Dct::lacZ)* et témoins.

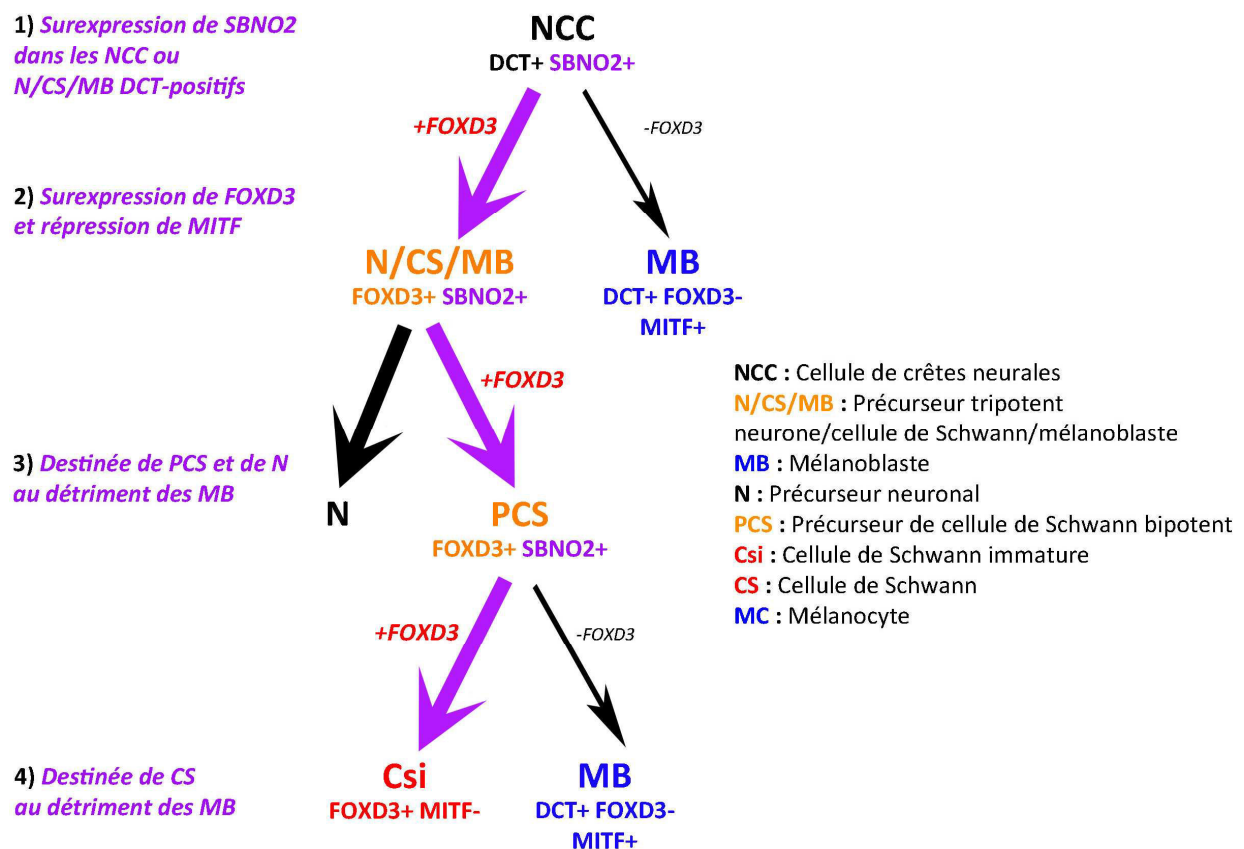


Figure 55 : Hypothèses sur l'origine du phénotype des embryons transgéniques

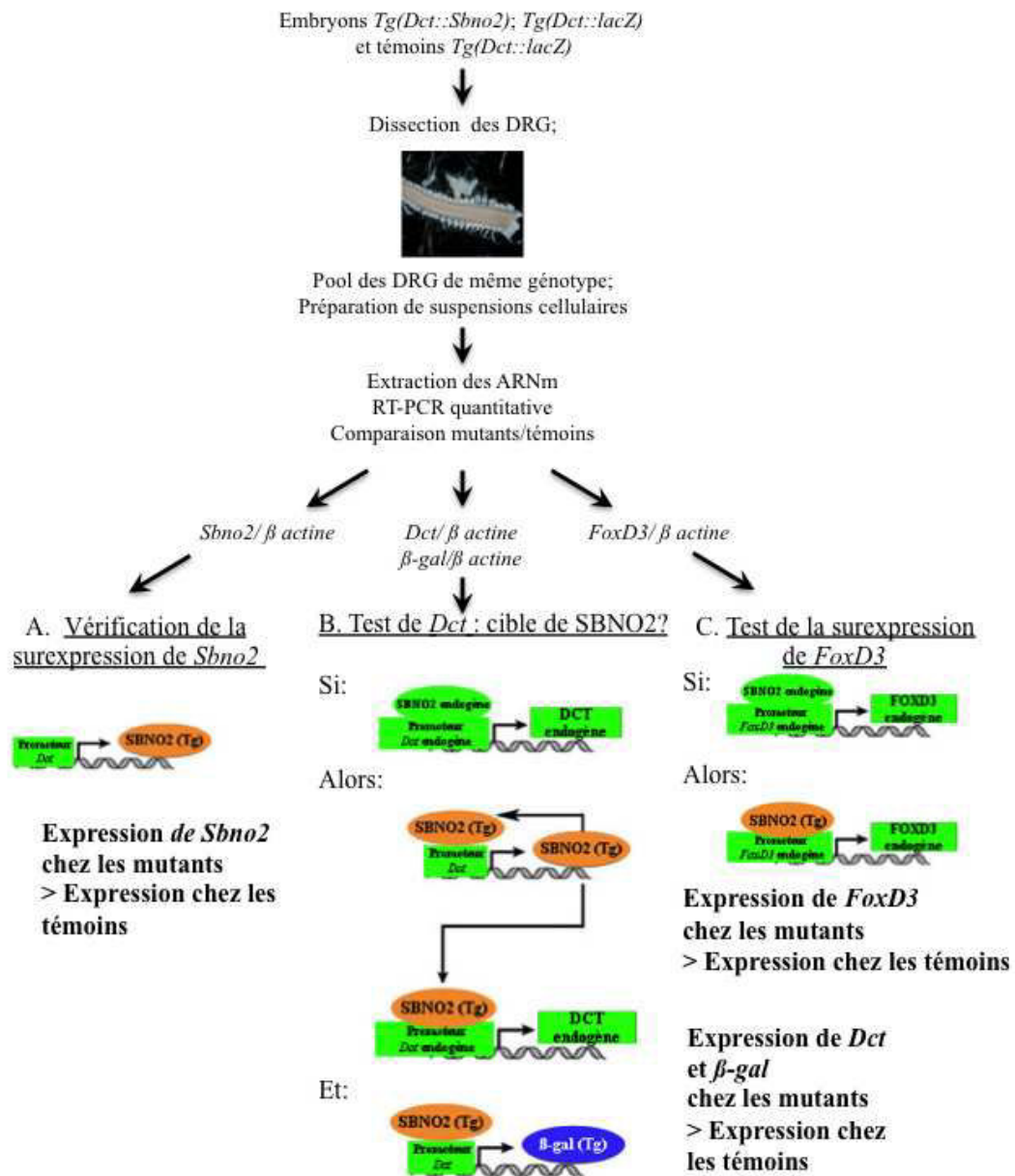


Figure 56 : Test de l'effet *enhancer* de la mutation SBNO2 sur l'expression de *Sbno2*, *Dct* et *Foxd3*

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié différents aspects de la biologie du lignage mélanocytaire, depuis le développement jusqu'à la transformation tumorale.

La lignée *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}* est un modèle de mélanome cutané largement répandu dont les caractéristiques phénotypiques n'avaient cependant pas été décrites complètement. Nous avons montré que son phénotype était plus complexe que prévu et que cette complexité devait être prise en compte pour interpréter correctement les résultats qui découlent de son utilisation. Bien que le modèle ait été développé avec l'intention de reproduire les mélanomes cutanés humains conventionnels, les lésions que nous avons observées ressemblent davantage morphologiquement à la famille des naevi bleus et aux naevi congénitaux géants.

La validité du modèle doit-elle pour autant être remise en question ? Nous ne le pensons pas car ce modèle parvient malgré tout à reproduire plusieurs caractéristiques du mélanome cutané : développement de mélanome à partir de naevi, naevi atypiques, lésions difficilement classables, variété morphologique des lésions, dissémination métastatique. Nous avons cependant constaté qu'une des forces de ce modèle était en quelque sorte aussi une faiblesse. En effet, de par sa construction, le modèle favorise grandement le développement de mélanomes mais ceci à partir de tous les mélanocytes, qu'ils soient cutanés ou non. Nous avons ainsi décrit des lésions mélanocytaires dans des organes autres que la peau et les sites de métastases classiques. Si nous avons réussi pour certaines d'entre elles à poser un diagnostic de tumeurs primitives ou métastatiques, d'autres demeurent de nature plus incertaine. En effet, la multiplicité des lésions cutanées ne permet pas toujours de retrouver la parenté de certaines métastases observées. La conséquence directe est que nous avons eu pour un type de lésions (naevi atypiques ou lésions de type C) de grandes difficultés à déterminer s'il s'agissait de lésions malignes ou pré-cancéreuses. Des modèles plus récents utilisant des systèmes d'induction par le tamoxifène permettent de contrôler plus précisément le développement spatio-temporel des lésions (Damsky et Bosenberg, 2010; Dankort *et al.*, 2009; Dhomen *et al.*, 2009). Il serait intéressant d'étudier les lésions des souris *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}* dans ce contexte afin de déterminer le potentiel malin des lésions de type C.

Malgré ces difficultés, nous avons pu définir les caractéristiques morphologiques des lésions mélanocytaires dans cette lignée, ce qui nous a permis par la suite d'évaluer les conséquences de l'haploinsuffisance de *Pax3* ou de la surexpression de *Rack1* dans ce modèle.

L'intérêt de la classification que nous avons proposée était également d'avoir été validée par un médecin dermatopathologiste spécialisé dans le mélanome qui a ainsi apporté une caution quant à la correspondance proposée entre les lésions de ce modèle et certaines tumeurs mélanocytaires humaines. Cette collaboration a également permis d'évaluer la pertinence de critères de diagnose que nous avons proposés. La prochaine étape sera d'évaluer si nos critères permettent un diagnostic

reproductible entre les chercheurs travaillant sur ce modèle, qu'ils soient ou non pathologistes de formation.

Contrairement à l'étude de la lignée *Tyr::NRAS^{Q61K}; Ink4a^{-/-}*, l'étude du phénotype de la lignée ***Tg(Dct::Sbno2)*** n'avait pas pour but de caractériser un modèle de maladie humaine mais de valider *Sbno2* en tant que support de la mutation patchwork d'une part, et d'étudier le rôle de *Sbno2* chez la souris d'autre part. Alors que nous cherchions à reproduire les caractéristiques du pelage des mutants patchwork en surexprimant *Sbno2* dans le lignage mélanocytaire, nous avons constaté chez les souris *Tg(Dct::Sbno2)* un phénotype beaucoup plus complexe associant également des lésions nerveuses et un comportement anormal.

En voulant caractériser le phénotype de cette lignée, nous nous sommes heurtés à des difficultés techniques. Malgré ces limitations, nous avons néanmoins pu constater un phénotype original associant anomalies de la pigmentation, blanchiment précoce et lésions nerveuses. Cette association entre lésions nerveuses et atteintes du lignage mélanocytaire nous est apparue d'autant plus intéressante qu'elle renvoie aux récentes découvertes qui révèlent le lien entre les cellules de Schwann et les mélanocytes au cours du développement. Dans ce modèle, *Foxd3* pourrait être le levier sur lequel SBNO2 agit pour favoriser la destinée gliale au détriment de la destinée mélanocytaire et ainsi expliquer le phénotype complexe que nous avons observé. Nous espérons réussir à confirmer cette hypothèse.

Nous avons vu qu'il existait chez l'homme plusieurs maladies qui associent mélanocytes et cellules de Schwann. Il n'existe cependant pas, à notre connaissance, de maladie humaine présentant les caractéristiques de la lignée *Tg(Dct::Sbno2)*. Les modèles animaux nous apprennent cependant que les mêmes causes ne produisent pas nécessairement les mêmes effets d'une espèce à l'autre. Le modèle *Tyr::NRAS; Ink4a^{-/-}* ou les modèles de neurofibromatose en sont de bonnes illustrations. Il n'est donc pas impossible que si des mutations de SBNO2 sont associées à une ou des maladies humaines, celles-ci puissent présenter un phénotype différent de celui que nous avons observé sur nos souris transgéniques. Compte-tenu de l'hyperactivité des souris *Tg(Dct::Sbno2)*, il était intéressant de constater que, bien que la fonction de *Sbno2* soit encore très mal connue chez les vertébrés, ce gène avait été associé à la schizophrénie dans une publication chez l'homme et qu'il semble jouer un rôle dans le développement du système nerveux central chez le poisson-zèbre.

En conclusion, ce travail de caractérisation de deux lignées de souris transgéniques montre à quel point l'interprétation et la description d'un phénotype dans un contexte aussi artificiel qu'un animal transgénique peuvent s'avérer complexes.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABBASI NR, SHAW HM, RIGEL DS, FRIEDMAN RJ, MCCARTHY WH, OSMAN I, et al. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA J Am Med Assoc.* 2004, **292**, 2771-2776.
2. ACKERMANN J, FRUTSCHI M, KALOULIS K, MCKEE T, TRUMPP A, BEERMANN F. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* 2005, **65**, 4005-4011.
3. ADAMEYKO I, LALLEMEND F. Glial versus melanocyte cell fate choice: Schwann cell precursors as a cellular origin of melanocytes. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2010, **67**, 3037-3055.
4. ADAMEYKO I, LALLEMEND F, AQUINO JB, PEREIRA JA, TOPILKO P, MÜLLER T, et al. Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell.* 2009, **139**, 366-379.
5. ADAMEYKO I, LALLEMEND F, FURLAN A, ZININ N, ARANDA S, KITAMBI SS, et al. Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. *Dev Camb Engl.* 2012, **139**, 397-410.
6. ADAMS DR, RON D, KIELY PA. RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Commun Signal CCS.* 2011, **9**, 22.
7. ALMEIDA MQ, MUCHOW M, BOIKOS S, BAUER AJ, GRIFFIN KJ, TSANG KM, et al. Mouse Prkar1a haploinsufficiency leads to an increase in tumors in the Trp53+/- or Rb1+/- backgrounds and chemically induced skin papillomas by dysregulation of the cell cycle and Wnt signaling. *Hum Mol Genet.* 2010, **19**, 1387-1398.
8. ARNHEITER H. The discovery of the microphthalmia locus and its gene, Mitf. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010, **23**, 729-735.
9. AUBIN-HOUZELSTEIN G, BERNEX F, ELBAZ C, PANTHIER JJ. Survival of patchwork melanoblasts is dependent upon their number in the hair follicle at the end of embryogenesis. *Dev Biol.* 1998, **198**, 266-276.
10. AUBIN-HOUZELSTEIN G, DA SILVA NR, BELLIER S, SALAÜN P, MONTAGUTELLI X, PANTHIER J-J. Genetic interaction between a maternal factor and the zygotic genome controls the intestine length in PRM/Alf mice. *Physiol Genomics.* 2003, **16**, 82-89.
11. AUBIN-HOUZELSTEIN G, DJIAN-ZAOUCHE J, BERNEX F, GADIN S, DELMAS V, LARUE L, et al. Melanoblasts' proper location and timed differentiation depend on Notch/RBP-J signaling in postnatal hair follicles. *J Invest Dermatol.* 2008, **128**, 2686-2695.
12. BASTIAN BC. The Molecular Pathology of Melanoma: An Integrated Taxonomy of Melanocytic Neoplasia. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2014, **9**, 239-271.
13. BAXTER LL, HOU L, LOFTUS SK, PAVAN WJ. Spotlight on spotted mice: a review of white spotting mouse mutants and associated human pigmentation disorders. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc.* 2004, **17**, 215-224.
14. BENNETT DC, LAMOREUX ML. The color loci of mice--a genetic century. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc.* 2003, **16**, 333-344.
15. BERMINGHAM-MCDONOGH O, XU YT, MARCHIONNI MA, SCHERER SS. Neuregulin expression in PNS neurons: isoforms and regulation by target interactions. *Mol Cell Neurosci.* 1997, **10**, 184-195.
16. BEVONA C, GOGGINS W, QUINN T, FULLERTON J, TSAO H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol.* 2003, **139**, 1620-1624; discussion 1624.

17. BHARTI K, LIU W, CSERMELY T, BERTUZZI S, ARNHEITER H. Alternative promoter use in eye development: the complex role and regulation of the transcription factor MITF. *Dev Camb Engl*. 2008, **135**, 1169-1178.
18. BHATTY M, FAN R, MUIR WM, PRUETT SB, NANDURI B. Transcriptomic analysis of peritoneal cells in a mouse model of sepsis: confirmatory and novel results in early and late sepsis. *BMC Genomics*. 2012, **13**, 509.
19. BIRD CC, WILLIS RA. The histogenesis of pigmented neurofibromas. *J Pathol*. 1969, **97**, 631-637.
20. BISMUTH K, MARIC D, ARNHEITER H. MITF and cell proliferation: the role of alternative splice forms. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc*. 2005, **18**, 349-359.
21. BJORNEBOE M. Melanosarcoma of brain, pigmented naevi of the skin and cutaneous neurofibromatosis. *Frankf Z Pathol*. 1934, **47**, 363-373.
22. BLAKE JA, ZIMAN MR. Pax3 transcripts in melanoblast development. *Dev Growth Differ*. 2005, **47**, 627-635.
23. BLAKE JA, ZIMAN MR. Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Dev Camb Engl*. 2014, **141**, 737-751.
24. BLANPAIN C, LOWRY WE, GEOGHEGAN A, POLAK L, FUCHS E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*. 2004, **118**, 635-648.
25. BOISSY RE, LAMOREUX ML. In vivo and in vitro morphological analysis of melanocytes homozygous for the misp allele at the murine microphthalmia locus. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc*. 1995, **8**, 294-301.
26. BONDURAND N, DASTOT-LE MOAL F, STANCHINA L, COLLOT N, BARAL V, MARLIN S, et al. Deletions at the SOX10 gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4. *Am J Hum Genet*. 2007, **81**, 1169-1185.
27. BONDURAND N, PINGAULT V, GOERICH DE, LEMORT N, SOCK E, LE CAIGNEC C, et al. Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet*. 2000, **9**, 1907-1917.
28. BOSSIS I, VOUTETAKIS A, MATYAKHINA L, PACK S, ABU-ASAB M, BOURDEAU I, et al. A pleiomorphic GH pituitary adenoma from a Carney complex patient displays universal allelic loss at the protein kinase A regulatory subunit 1A (PRKARIA) locus. *J Med Genet*. 2004, **41**, 596-600.
29. BOYD KP, KORF BR, THEOS A. Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol*. 2009, **61**, 1-16.
30. BRAY SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006, **7**, 678-689.
31. BRESLOW A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*. 1970, **172**, 902-908.
32. BUCKINGHAM M, RELAX F. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007, **23**, 645-673.
33. BURDEN S, YARDEN Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron*. 1997, **18**, 847-855.
34. CAMPAGNE C. Implication de la protéine RACK1 dans le développement du mélanome cutané in vivo. Thèse de doctorat. 2012, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, 354 p.
35. CARBONELL AL, BOYA J, GARCÍA-MAURIÑO JE. Presence of melanin in normal human Schwann cells. *Histol Histopathol*. 1992, **7**, 329-332.

36. CARNEY JA. Psammomatous melanotic schwannoma. A distinctive, heritable tumor with special associations, including cardiac myxoma and the Cushing syndrome. *Am J Surg Pathol*. 1990, **14**, 206-222.
37. CARNEY JA. Carney complex: the complex of myxomas, spotty pigmentation, endocrine overactivity, and schwannomas. *Semin Dermatol*. 1995, **14**, 90-98.
38. CARNEY JA, HRUSKA LS, BEAUCHAMP GD, GORDON H. Dominant inheritance of the complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Mayo Clin Proc*. 1986, **61**, 165-172.
39. CARREIRA S, GOODALL J, DENAT L, RODRIGUEZ M, NUCIFORO P, HOEK KS, et al. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev*. 2006, **20**, 3426-3439.
40. CASEY M, VAUGHAN CJ, HE J, HATCHER CJ, WINTER JM, WEREMOWICZ S, et al. Mutations in the protein kinase A R1alpha regulatory subunit cause familial cardiac myxomas and Carney complex. *J Clin Invest*. 2000, **106**, R31-38.
41. CHASE HB. Growth of the hair. *Physiol Rev*. 1954, **34**, 113-126.
42. CHEN LL, JAIMES N, BARKER CA, BUSAM KJ, MARGHOOB AA. Desmoplastic melanoma: a review. *J Am Acad Dermatol*. 2013, **68**, 825-833.
43. CICHOREK M, WACHULSKA M, STASIEWICZ A, TYMIŃSKA A. Skin melanocytes: biology and development. *Postępy Dermatol Alergol*. 2013, **30**, 30-41.
44. CICHOWSKI K, SHIH TS, SCHMITT E, SANTIAGO S, REILLY K, MCLAUGHLIN ME, et al. Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science*. 1999, **286**, 2172-2176.
45. CLARKE LE. Dysplastic nevi. *Clin Lab Med*. 2011, **31**, 255-265.
46. CLOSE B, BANISTER K, BAUMANS V, BERNOTH EM, BROMAGE N, BUNYAN J, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. *Lab Anim*. 1997, **31**, 1-32.
47. COHEN AM, KONIGSBERG IR. A clonal approach to the problem of neural crest determination. *Dev Biol*. 1975, **46**, 262-280.
48. COOK AL, SMITH AG, SMIT DJ, LEONARD JH, STURM RA. Co-expression of SOX9 and SOX10 during melanocytic differentiation in vitro. *Exp Cell Res*. 2005, **308**, 222-235.
49. COOPER CD, RAIBLE DW. Mechanisms for reaching the differentiated state: Insights from neural crest-derived melanocytes. *Semin Cell Dev Biol*. 2009, **20**, 105-110.
50. COTSARELIS G, CHENG SZ, DONG G, SUN TT, LAVKER RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*. 1989, **57**, 201-209.
51. COYLE-THOMPSON CA, BANERJEE U. The strawberry notch gene functions with Notch in common developmental pathways. *Dev Camb Engl*. 1993, **119**, 377-395.
52. CURRAN K, RAIBLE DW, LISTER JA. Foxd3 controls melanophore specification in the zebrafish neural crest by regulation of Mitf. *Dev Biol*. 2009, **332**, 408-417.
53. CURTIN JA, BUSAM K, PINKEL D, BASTIAN BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006, **24**, 4340-4346.
54. DAHL AA. Ophthalmologic Manifestations of Neurofibromatosis Type 1 [En ligne]. *MedScape*. 2013,. [<http://emedicine.medscape.com/article/1219222-overview#aw2aab6b4>] (consulté le 28/3/14).
55. DAMSKY WE Jr, BOSENBERG M. Mouse melanoma models and cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010, **23**, 853-859.

56. DANKORT D, CURLEY DP, CARLIDGE RA, NELSON B, KARNEZIS AN, DAMSKY WE Jr, et al. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet.* 2009, **41**, 544-552.
57. DASTON MM, RATNER N. Neurofibromin, a predominantly neuronal GTPase activating protein in the adult, is ubiquitously expressed during development. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* 1992, **195**, 216-226.
58. DAVIS IJ, KIM JJ, OZSOLAK F, WIDLUND HR, ROZENBLATT-ROSEN O, GRANTER SR, et al. Oncogenic MITF dysregulation in clear cell sarcoma: defining the MiT family of human cancers. *Cancer Cell.* 2006, **9**, 473-484.
59. DE SCHEPPER S, BOUCNEAU J, LAMBERT J, MESSIAEN L, NAEYAERT J-M. Pigment cell-related manifestations in neurofibromatosis type 1: an overview. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc.* 2005, **18**, 13-24.
60. DE SCHEPPER S, BOUCNEAU J, VANDER HAEGHEN Y, MESSIAEN L, NAEYAERT J-M, LAMBERT J. Café-au-lait spots in neurofibromatosis type 1 and in healthy control individuals: hyperpigmentation of a different kind? *Arch Dermatol Res.* 2006, **297**, 439-449.
61. DE SCHEPPER S, MAERTENS O, CALLENS T, NAEYAERT J-M, LAMBERT J, MESSIAEN L. Somatic mutation analysis in NF1 café au lait spots reveals two NF1 hits in the melanocytes. *J Invest Dermatol.* 2008, **128**, 1050-1053.
62. DEDIOL I, BULAT V, ZIVKOVIĆ MV, MARKOVIĆ BM, SITUM M. Dysplastic nevus - risk factor or disguise for melanoma. *Coll Antropol.* 2011, **35 Suppl 2**, 311-313.
63. DEL BARRIO MG, NIETO MA. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Dev Camb Engl.* 2002, **129**, 1583-1593.
64. DEL MARMOL V, BEERMANN F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* 1996, **381**, 165-168.
65. DELMAS V, MARTINOZZI S, BOURGEOIS Y, HOLZENBERGER M, LARUE L. Cre-mediated recombination in the skin melanocyte lineage. *Genes N Y N 2000.* 2003, **36**, 73-80.
66. DENECKER G, VANDAMME N, AKAY O, KOLUDROVIC D, TAMINAU J, LEMEIRE K, et al. Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ.* 2014,.
67. DEO M, HUANG JL-Y, FUCHS H, DE ANGELIS MH, VAN RAAMSDONK CD. Differential effects of neurofibromin gene dosage on melanocyte development. *J Invest Dermatol.* 2013, **133**, 49-58.
68. DHOMEN N, REIS-FILHO JS, DA ROCHA DIAS S, HAYWARD R, SAVAGE K, DELMAS V, et al. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell.* 2009, **15**, 294-303.
69. DJIAN-ZAOUCHE J. Etude du contrôle de l'homéostasie des cellules souches des mélanocytes chez la souris. Thèse de doctorat. 2008, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, 250 p.
70. DONG Z, BRENNAN A, LIU N, YARDEN Y, LEFKOWITZ G, MIRSKY R, et al. Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron.* 1995, **15**, 585-596.
71. DOTTORI M, GROSS MK, LABOSKY P, GOULDING M. The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate. *Dev Camb Engl.* 2001, **128**, 4127-4138.
72. DOUARIN NL, KALCHEIM C. *The Neural Crest.* 1999, Cambridge University Press, 494 p.

73. DUNN KJ, BRADY M, OCHSENBAUER-JAMBOR C, SNYDER S, INCAO A, PAVAN WJ. WNT1 and WNT3a promote expansion of melanocytes through distinct modes of action. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc*. 2005, **18**, 167-180.
74. DUPIN E. [Phenotypic plasticity of neural crest-derived melanocytes and Schwann cells]. *Biol Aujourdhui*. 2011, **205**, 53-61.
75. DUPIN E, GLAVIEUX C, VAIGOT P, LE DOUARIN NM. Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, **97**, 7882-7887.
76. DUPIN E, REAL C, GLAVIEUX-PARDANAUD C, VAIGOT P, LE DOUARIN NM. Reversal of developmental restrictions in neural crest lineages: transition from Schwann cells to glial-melanocytic precursors in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, **100**, 5229-5233.
77. DUTTON KA, PAULINY A, LOPES SS, ELWORTHY S, CARNEY TJ, RAUCH J, et al. Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. *Dev Camb Engl*. 2001, **128**, 4113-4125.
78. EGGERMONT AM, SPATZ A, ROBERT C. Cutaneous melanoma. *The Lancet*. 2013,.
79. EGIDY G, JULÉ S, BOSSÉ P, BERNEX F, GEFFROTIN C, VINCENT-NAULLEAU S, et al. Transcription analysis in the MeLiM swine model identifies RACK1 as a potential marker of malignancy for human melanocytic proliferation. *Mol Cancer*. 2008, **7**, 34.
80. EL KASMI KC, SMITH AM, WILLIAMS L, NEALE G, PANOPOULOS AD, PANOPOLOUS A, et al. Cutting edge: A transcriptional repressor and corepressor induced by the STAT3-regulated anti-inflammatory signaling pathway. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007, **179**, 7215-7219.
81. EPSTEIN DJ, MALO D, VEKEMANS M, GROS P. Molecular characterization of a deletion encompassing the splotch mutation on mouse chromosome 1. *Genomics*. 1991a, **10**, 89-93.
82. EPSTEIN DJ, VEKEMANS M, GROS P. Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell*. 1991b, **67**, 767-774.
83. EPSTEIN DJ, VOGAN KJ, TRASLER DG, GROS P. A mutation within intron 3 of the Pax-3 gene produces aberrantly spliced mRNA transcripts in the splotch (Sp) mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993, **90**, 532-536.
84. ERICKSON CA, GOINS TL. Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. *Dev Camb Engl*. 1995, **121**, 915-924.
85. ERNFORS P. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Exp Cell Res*. 2010, **316**, 1397-1407.
86. ERNST H, RITTINGHAUSEN S, WAHNSCHAFTE U, MOHR U. Induction of malignant peripheral nerve sheath tumors in European hamsters with 1,1-dimethylhydrazine (UDMH). *Cancer Lett*. 1987, **35**, 303-311.
87. ESKANDARPOUR M, HASHEMI J, KANTER L, RINGBORG U, PLATZ A, HANSSON J. Frequency of UV-inducible NRAS mutations in melanomas of patients with germline CDKN2A mutations. *J Natl Cancer Inst*. 2003, **95**, 790-798.
88. FETSCH JF, MICHAL M, MIETTINEN M. Pigmented (melanotic) neurofibroma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 19 lesions from 17 patients. *Am J Surg Pathol*. 2000, **24**, 331-343.
89. FIDLER IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature New Biol*. 1973, **242**, 148-149.

90. FORTINI ME. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002, **3**, 673-684.
91. FOUNTAIN JW, WALLACE MR, BRUCE MA, SEIZINGER BR, MENON AG, GUSELLA JF, et al. Physical mapping of a translocation breakpoint in neurofibromatosis. *Science.* 1989, **244**, 1085-1087.
92. GALIBERT MD, YAVUZER U, DEXTER TJ, GODING CR. Pax3 and regulation of the melanocyte-specific tyrosinase-related protein-1 promoter. *J Biol Chem.* 1999, **274**, 26894-26900.
93. GARCIA RI, SZABO G. Melanosomes in dermal Schwann cells of human and rodent skin. *Arch Dermatol Res.* 1979, **264**, 83-87.
94. GARCÍA-CASTRO MI, MARCELLE C, BRONNER-FRASER M. Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science.* 2002, **297**, 848-851.
95. GARRAWAY LA, WIDLUND HR, RUBIN MA, GETZ G, BERGER AJ, RAMASWAMY S, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature.* 2005, **436**, 117-122.
96. GILBERT SF. The Developmental Mechanics of Cell Specification [En ligne]. 2000,. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9968/>] (consulté le 8/5/14).
97. GILLARD M, CADIEU E, DE BRITO C, ABADIE J, VERGIER B, DEVAUCHELLE P, et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013, n/a-n/a.
98. GODING CR. Commentary. A picture of Mitf in melanoma immortality. *Oncogene.* 2011, **30**, 2304-2306.
99. GOITRE L, TRAPANI E, TRABALZINI L, RETTA SF. The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2014, **1120**, 1-18.
100. GOLDSTEIN AM, CHAN M, HARLAND M, HAYWARD NK, DEMENAIIS F, BISHOP DT, et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet.* 2007, **44**, 99-106.
101. GOULDING M, STERRER S, FLEMING J, BALLING R, NADEAU J, MOORE KJ, et al. Analysis of the Pax-3 gene in the mouse mutant *plotch*. *Genomics.* 1993, **17**, 355-363.
102. GRAY-SCHOPFER V, WELLBROCK C, MARAIS R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 2007, **445**, 851-857.
103. GRINSPAN JB, MARCHIONNI MA, REEVES M, COULALOGLOU M, SCHERER SS. Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1996, **16**, 6107-6118.
104. GUILLOT B, DALAC S, DELAUNAY M, BACCARD M, CHEVRANT-BRETON J, DEREURE O, et al. Cutaneous malignant melanoma and neurofibromatosis type 1. *Melanoma Res.* 2004, **14**, 159-163.
105. GUTMANN DH, AYLSWORTH A, CAREY JC, KORF B, MARKS J, PYERITZ RE, et al. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA J Am Med Assoc.* 1997, **278**, 51-57.
106. GUTMANN DH, GIOVANNINI M. Mouse Models of Neurofibromatosis 1 and 2. *Neoplasia N Y N.* 2002, **4**, 279-290.
107. GUTZMER R, HERBST RA, MOMMERT S, KIEHL P, MATIASKE F, RÜTTEN A, et al. Allelic loss at the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene locus is frequent in desmoplastic neurotropic melanoma. *Hum Genet.* 2000, **107**, 357-361.

108. GUYONNEAU L, MURISIER F, ROSSIER A, MOULIN A, BEERMANN F. Melanocytes and pigmentation are affected in dopachrome tautomerase knockout mice. *Mol Cell Biol.* 2004, **24**, 3396-3403.
109. HA L, NOONAN FP, DE FABO EC, MERLINO G. Animal models of melanoma. *J Investig Dermatol Symp Proc Soc Investig Dermatol Inc Eur Soc Dermatol Res.* 2005, **10**, 86-88.
110. HAASS NK, HERLYN M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Investig Dermatol Symp Proc Soc Investig Dermatol Inc Eur Soc Dermatol Res.* 2005, **10**, 153-163.
111. HALLSSON JH, FAVOR J, HODGKINSON C, GLASER T, LAMOREUX ML, MAGNÚSDÓTTIR R, et al. Genomic, transcriptional and mutational analysis of the mouse microphthalmia locus. *Genetics.* 2000, **155**, 291-300.
112. HANNA LA, FOREMAN RK, TARASENKO IA, KESSLER DS, LABOSKY PA. Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo. *Genes Dev.* 2002, **16**, 2650-2661.
113. HARDING HE, PASSEY RD. A transplantable melanoma of the mouse. *J Pathol Bacteriol.* 1930, **33**, 417-427.
114. HARI L, MIESCHER I, SHAKHOVA O, SUTER U, CHIN L, TAKETO M, et al. Temporal control of neural crest lineage generation by Wnt/ β -catenin signaling. *Dev Camb Engl.* 2012, **139**, 2107-2117.
115. HARRIS ML, BAXTER LL, LOFTUS SK, PAVAN WJ. Sox proteins in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010, **23**, 496-513.
116. HARRIS ML, BUAC K, SHAKHOVA O, HAKAMI RM, WEGNER M, SOMMER L, et al. A dual role for SOX10 in the maintenance of the postnatal melanocyte lineage and the differentiation of melanocyte stem cell progenitors. *PLoS Genet.* 2013, **9**, e1003644.
117. HARRIS ML, ERICKSON CA. Lineage specification in neural crest cell pathfinding. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* 2007, **236**, 1-19.
118. HE S, YOON H-S, SUH B-J, ECCLES MR. PAX3 Is extensively expressed in benign and malignant tissues of the melanocytic lineage in humans. *J Invest Dermatol.* 2010, **130**, 1465-1468.
119. HENION PD, WESTON JA. Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Dev Camb Engl.* 1997, **124**, 4351-4359.
120. HERBARTH B, PINGAULT V, BONDURAND N, KUHLBRODT K, HERMANS-BORGMEYER I, PULITI A, et al. Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, **95**, 5161-5165.
121. HIROBE T. Control of melanocyte proliferation and differentiation in the mouse epidermis. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc.* 1992, **5**, 1-11.
122. HIROBE T. Structure and function of melanocytes: microscopic morphology and cell biology of mouse melanocytes in the epidermis and hair follicle. *Histol Histopathol.* 1995, **10**, 223-237.
123. HOCKER T, TSAO H. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat.* 2007, **28**, 578-588.
124. HORNYAK TJ. The developmental biology of melanocytes and its application to understanding human congenital disorders of pigmentation. *Adv Dermatol.* 2006, **22**, 201-218.
125. HORNYAK TJ, HAYES DJ, CHIU LY, ZIFF EB. Transcription factors in melanocyte development: distinct roles for Pax-3 and Mitf. *Mech Dev.* 2001, **101**, 47-59.
126. HOTH CF, MILUNSKY A, LIPSKY N, SHEFFER R, CLARREN SK, BALDWIN CT. Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I). *Am J Hum Genet.* 1993, **52**, 455-462.

127. HOU L, PANTHIER JJ, ARNHEITER H. Signaling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interactions between KIT and MITF. *Dev Camb Engl*. 2000, **127**, 5379-5389.
128. HOU L, PAVAN WJ. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? *Cell Res*. 2008, **18**, 1163-1176.
129. HUSON SM, HARPER PS, COMPSTON DA. Von Recklinghausen neurofibromatosis. A clinical and population study in south-east Wales. *Brain J Neurol*. 1988, **111 (Pt 6)**, 1355-1381.
130. HUTTENBACH Y, PRIETO VG, REED JA. Desmoplastic and spindle cell melanomas express protein markers of the neural crest but not of later committed stages of Schwann cell differentiation. *J Cutan Pathol*. 2002, **29**, 562-568.
131. IGNATIUS MS, MOOSE HE, EL-HODIRI HM, HENION PD. colgate/hdac1 Repression of foxd3 expression is required to permit mitfa-dependent melanogenesis. *Dev Biol*. 2008, **313**, 568-583.
132. IWAMOTO T, TAKAHASHI M, ITO M, HAMATANI K, OHBAYASHI M, WAJJWALKU W, et al. Aberrant melanogenesis and melanocytic tumour development in transgenic mice that carry a metallothionein/ret fusion gene. *EMBO J*. 1991, **10**, 3167-3175.
133. JACKS T, SHIH TS, SCHMITT EM, BRONSON RT, BERNARDS A, WEINBERG RA. Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nat Genet*. 1994, **7**, 353-361.
134. JACKSON IJ. A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the brown locus in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988, **85**, 4392-4396.
135. JACKSON IJ, CHAMBERS DM, TSUKAMOTO K, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, et al. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J*. 1992, **11**, 527-535.
136. JAIMES N, CHEN L, DUSZA SW, CARRERA C, PUIG S, THOMAS L, et al. Clinical and dermoscopic characteristics of desmoplastic melanomas. *JAMA Dermatol*. 2013, **149**, 413-421.
137. JESSEN KR, MIRSKY R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*. 2005, **6**, 671-682.
138. JHAPPAN C, NOONAN FP, MERLINO G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene*. 2003, **22**, 3099-3112.
139. JORDAN SA, JACKSON IJ. MGF (KIT ligand) is a chemokinetic factor for melanoblast migration into hair follicles. *Dev Biol*. 2000, **225**, 424-436.
140. JOSEPH NM, MUKOUYAMA Y-S, MOSHER JT, JAEGLE M, CRONE SA, DORMAND E-L, et al. Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Dev Camb Engl*. 2004, **131**, 5599-5612.
141. KELSH RN. Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 2006, **28**, 788-798.
142. KIM C, CHENG CY, SALDANHA SA, TAYLOR SS. PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell*. 2007, **130**, 1032-1043.
143. KING R, WEILBAECHER KN, MCGILL G, COOLEY E, MIHM M, FISHER DE. Microphthalmia transcription factor. A sensitive and specific melanocyte marker for Melanoma Diagnosis. *Am J Pathol*. 1999, **155**, 731-738.
144. KIRSCHNER LS. Use of mouse models to understand the molecular basis of tissue-specific tumorigenesis in the Carney complex. *J Intern Med*. 2009, **266**, 60-68.

145. KIRSCHNER LS, CARNEY JA, PACK SD, TAYMANS SE, GIATZAKIS C, CHO YS, et al. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet.* 2000, **26**, 89-92.
146. KIRSCHNER LS, KUSEWITT DF, MATYAKHINA L, TOWNS WH 2nd, CARNEY JA, WESTPHAL H, et al. A mouse model for the Carney complex tumor syndrome develops neoplasia in cyclic AMP-responsive tissues. *Cancer Res.* 2005, **65**, 4506-4514.
147. KOBAYASHI T, URABE K, WINDER A, JIMÉNEZ-CERVANTES C, IMOKAWA G, BREWINGTON T, et al. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J.* 1994, **13**, 5818-5825.
148. KOH HK. Cutaneous melanoma. *N Engl J Med.* 1991, **325**, 171-182.
149. KORF BR. The phakomatoses. *Clin Dermatol.* 2005, **23**, 78-84.
150. KOS R, REEDY MV, JOHNSON RL, ERICKSON CA. The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Dev Camb Engl.* 2001, **128**, 1467-1479.
151. KRISPIN S, NITZAN E, KASSEM Y, KALCHEIM C. Evidence for a dynamic spatiotemporal fate map and early fate restrictions of premigratory avian neural crest. *Dev Camb Engl.* 2010, **137**, 585-595.
152. KUNISADA T, LU SZ, YOSHIDA H, NISHIKAWA S, NISHIKAWA S, MIZOGUCHI M, et al. Murine cutaneous mastocytosis and epidermal melanocytosis induced by keratinocyte expression of transgenic stem cell factor. *J Exp Med.* 1998, **187**, 1565-1573.
153. KÜSTERS-VANDEVELDE HVN, VAN ENGEN-VAN GRUNSVEN IACH, KÜSTERS B, VAN DIJK MRCF, GROENEN PJTA, WESSELING P, et al. Improved discrimination of melanotic schwannoma from melanocytic lesions by combined morphological and GNAQ mutational analysis. *Acta Neuropathol (Berl).* 2010, **120**, 755-764.
154. KWON BS, HAQ AK, POMERANTZ SH, HALABAN R. Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987, **84**, 7473-7477.
155. LAI EC. Developmental signaling: shrimp and strawberries help flies make cones. *Curr Biol CB.* 2002, **12**, R722-724.
156. LANDSBERG J, GAFFAL E, CRON M, KOHLMAYER J, RENN M, TÜTING T. Autochthonous primary and metastatic melanomas in Hgf-Cdk4 R24C mice evade T-cell-mediated immune surveillance. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010, **23**, 649-660.
157. LANG D, LU MM, HUANG L, ENGLEKA KA, ZHANG M, CHU EY, et al. Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature.* 2005, **433**, 884-887.
158. LARUE L, BEERMANN F. Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc.* 2007, **20**, 485-497.
159. LAVKER RM, SUN T-T, OSHIMA H, BARRANDON Y, AKIYAMA M, FERRARIS C, et al. Hair follicle stem cells. *J Investig Dermatol Symp Proc Soc Investig Dermatol Inc Eur Soc Dermatol Res.* 2003, **8**, 28-38.
160. LAW MH, MACGREGOR S, HAYWARD NK. Melanoma genetics: recent findings take us beyond well-traveled pathways. *J Invest Dermatol.* 2012, **132**, 1763-1774.
161. LE DOUARIN N, TEILLET MA. [Several aspects of migration of neural cells in chick embryo studied by the method of heterospecific grafts of the neural tube]. *Comptes Rendus Séances Société Biol Ses Fil.* 1970, **164**, 390-397.

162. LE DOUARIN NM, CALLONI GW, DUPIN E. The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle Georget Tex*. 2008, **7**, 1013-1019.
163. LE DOUARIN NM, DUPIN E. Multipotentiality of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev*. 2003, **13**, 529-536.
164. LEE A-Y. Role of keratinocytes in the development of vitiligo. *Ann Dermatol*. 2012, **24**, 115-125.
165. LEE J-H, CHOI J-W, KIM Y-S. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2011, **164**, 776-784.
166. LEE S-A, TSAO TT-H, YANG K-C, LIN H, KUO Y-L, HSU C-H, et al. Construction and analysis of the protein-protein interaction networks for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. *BMC Bioinformatics*. 2011, **12 Suppl 13**, S20.
167. LEHMANN OJ, SOWDEN JC, CARLSSON P, JORDAN T, BHATTACHARYA SS. Fox's in development and disease. *Trends Genet TIG*. 2003, **19**, 339-344.
168. LEONE DP, GENOUD S, ATANASOSKI S, GRAUSENBURGER R, BERGER P, METZGER D, et al. Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Mol Cell Neurosci*. 2003, **22**, 430-440.
169. LEVY C, KHALED M, FISHER DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med*. 2006, **12**, 406-414.
170. LI A. The biology of melanocyte and melanocyte stem cell. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2014, **46**, 255-260.
171. LI H-Y, SAY EHM, ZHOU X-F. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2007, **25**, 2053-2065.
172. LINDNER G, BOTCHKAREV VA, BOTCHKAREVA NV, LING G, VAN DER VEEN C, PAUS R. Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol*. 1997, **151**, 1601-1617.
173. LISTER JA, COOPER C, NGUYEN K, MODRELL M, GRANT K, RAIBLE DW. Zebrafish Foxd3 is required for development of a subset of neural crest derivatives. *Dev Biol*. 2006, **290**, 92-104.
174. LOERCHER AE, TANK EMH, DELSTON RB, HARBOUR JW. MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J Cell Biol*. 2005, **168**, 35-40.
175. LWIGALE PY, CONRAD GW, BRONNER-FRASER M. Graded potential of neural crest to form cornea, sensory neurons and cartilage along the rostrocaudal axis. *Dev Camb Engl*. 2004, **131**, 1979-1991.
176. MACHADO AF, MARTIN LJ, COLLINS MD. Pax3 and the splotch mutations: structure, function, and relationship to teratogenesis, including gene-chemical interactions. *Curr Pharm Des*. 2001, **7**, 751-785.
177. MACKENZIE MA, JORDAN SA, BUDD PS, JACKSON IJ. Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev Biol*. 1997, **192**, 99-107.
178. MAERTENS O, BREMS H, VANDESOMPELE J, DE RAEDT T, HEYNS I, ROSENBAUM T, et al. Comprehensive NF1 screening on cultured Schwann cells from neurofibromas. *Hum Mutat*. 2006, **27**, 1030-1040.
179. MAJUMDAR A, NAGARAJ R, BANERJEE U. strawberry notch encodes a conserved nuclear protein that functions downstream of Notch and regulates gene expression along the developing wing margin of Drosophila. *Genes Dev*. 1997, **11**, 1341-1353.
180. MAK S-S, MORIYAMA M, NISHIOKA E, OSAWA M, NISHIKAWA S-I. Indispensable role of Bcl2 in the development of the melanocyte stem cell. *Dev Biol*. 2006, **291**, 144-153.

181. MALCHAU SS, HAYDEN J, HORNICEK F, MANKIN HJ. Clear cell sarcoma of soft tissues. *J Surg Oncol*. 2007, **95**, 519-522.
182. MARUYAMA K, UEMATSU S, KONDO T, TAKEUCHI O, MARTINO MM, KAWASAKI T, et al. Strawberry notch homologue 2 regulates osteoclast fusion by enhancing the expression of DC-STAMP. *J Exp Med*. 2013, **210**, 1947-1960.
183. MAYER TC. Site of gene action in steel mice: analysis of the pigment defect by mesoderm-ectoderm recombinations. *J Exp Zool*. 1973, **184**, 345-352.
184. MAYES DA, RIZVI TA, CANCELAS JA, KOLASINSKI NT, CIRAOLO GM, STEMMER-RACHAMIMOV AO, et al. Perinatal or adult Nf1 inactivation using tamoxifen-inducible PlpCre each cause neurofibroma formation. *Cancer Res*. 2011, **71**, 4675-4685.
185. MCCLATCHEY AI. Neurofibromatosis. *Annu Rev Pathol*. 2007, **2**, 191-216.
186. MESSIAEN LM, CALLENS T, MORTIER G, BEYSEN D, VANDENBROUCKE I, VAN ROY N, et al. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat*. 2000, **15**, 541-555.
187. MICHALSKI J-P, ANDERSON C, BEAUVAIS A, DE REPENTIGNY Y, KOTHARY R. The proteolipid protein promoter drives expression outside of the oligodendrocyte lineage during embryonic and early postnatal development. *PloS One*. 2011, **6**, e19772.
188. MOASE CE, TRASLER DG. Delayed neural crest cell emigration from Sp and Spd mouse neural tube explants. *Teratology*. 1990, **42**, 171-182.
189. MOHAMED A, GONZALEZ RS, LAWSON D, WANG J, COHEN C. SOX10 expression in malignant melanoma, carcinoma, and normal tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM Off Publ Soc Appl Immunohistochem*. 2013, **21**, 506-510.
190. MOLLAAGHABABA R, PAVAN WJ. The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene*. 2003, **22**, 3024-3034.
191. MONTOLIU L, GRØNSKOV K, WEI A-H, MARTÍNEZ-GARCÍA M, FERNÁNDEZ A, ARVEILER B, et al. Increasing the complexity: new genes and new types of albinism. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014, **27**, 11-18.
192. MOOI WJ, KRAUSZ T. *Pathology of Melanocytic Disorders*, 2nd ed. 2007,.
193. MORIYAMA M, OSAWA M, MAK S-S, OHTSUKA T, YAMAMOTO N, HAN H, et al. Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. *J Cell Biol*. 2006, **173**, 333-339.
194. MORRISON SJ, SPRADLING AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008, **132**, 598-611.
195. MOTOHASHI H, HOZAWA K, OSHIMA T, TAKEUCHI T, TAKASAKA T. Dysgenesis of melanocytes and cochlear dysfunction in mutant microphthalmia (mi) mice. *Hear Res*. 1994, **80**, 10-20.
196. MOURY JD, JACOBSON AG. Neural fold formation at newly created boundaries between neural plate and epidermis in the axolotl. *Dev Biol*. 1989, **133**, 44-57.
197. MOURY JD, JACOBSON AG. The origins of neural crest cells in the axolotl. *Dev Biol*. 1990, **141**, 243-253.
198. MÜLLER-RÖVER S, HANDJISKI B, VAN DER VEEN C, EICHMÜLLER S, FOITZIK K, MCKAY IA, et al. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol*. 2001, **117**, 3-15.

199. MURILLO-CUESTA S, CONTRERAS J, ZURITA E, CEDIEL R, CANTERO M, VARELA-NIETO I, et al. Melanin precursors prevent premature age-related and noise-induced hearing loss in albino mice. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010, **23**, 72-83.
200. MURISIER F, GUICHARD S, BEERMANN F. Distinct distal regulatory elements control tyrosinase expression in melanocytes and the retinal pigment epithelium. *Dev Biol.* 2007, **303**, 838-847.
201. NAKAYAMA A, NGUYEN MT, CHEN CC, OPDECAMP K, HODGKINSON CA, ARNHEITER H. Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deafness gene MITF, affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently. *Mech Dev.* 1998, **70**, 155-166.
202. Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference . *Arch Neurol.* 1988, **45**, 575-578.
203. NISHIMURA EK, GRANTER SR, FISHER DE. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science.* 2005, **307**, 720-724.
204. NISHIMURA EK, JORDAN SA, OSHIMA H, YOSHIDA H, OSAWA M, MORIYAMA M, et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature.* 2002, **416**, 854-860.
205. NITZAN E, KRISPIN S, PFALTZGRAFF ER, KLAR A, LABOSKY PA, KALCHEIM C. A dynamic code of dorsal neural tube genes regulates the segregation between neurogenic and melanogenic neural crest cells. *Dev Camb Engl.* 2013a, **140**, 2269-2279.
206. NITZAN E, PFALTZGRAFF ER, LABOSKY PA, KALCHEIM C. Neural crest and Schwann cell progenitor-derived melanocytes are two spatially segregated populations similarly regulated by Foxd3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013b, **110**, 12709-12714.
207. NOONAN FP, RECIO JA, TAKAYAMA H, DURAY P, ANVER MR, RUSH WL, et al. Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature.* 2001, **413**, 271-272.
208. OBRINGER AC, MEADOWS AT, ZACKAI EH. The diagnosis of neurofibromatosis-1 in the child under the age of 6 years. *Am J Dis Child 1960.* 1989, **143**, 717-719.
209. OPDECAMP K, NAKAYAMA A, NGUYEN MT, HODGKINSON CA, PAVAN WJ, ARNHEITER H. Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Dev Camb Engl.* 1997, **124**, 2377-2386.
210. ORCHARD GE. Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J.* 2000, **32**, 475-481.
211. ORLOW SJ. Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol.* 1995, **105**, 3-7.
212. ORTONNE JP, BROCARD E, FLORET D, PERROT H, THIVOLET J. [Diagnostic value of café-au-lait spots (author's transl)]. *Ann Dermatol Vénéréologie.* 1980, **107**, 313-327.
213. OSAWA. Melanocyte stem cells. *StemBook.* 2009,.
214. OSAWA M, EGAWA G, MAK S-S, MORIYAMA M, FRETER R, YONETANI S, et al. Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche. *Dev Camb Engl.* 2005, **132**, 5589-5599.
215. OSHIMA H, ROCHAT A, KEDZIA C, KOBAYASHI K, BARRANDON Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell.* 2001, **104**, 233-245.
216. OVERWIJK WW, RESTIFO NP. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol Ed John E Coligan Al.* 2001, **Chapter 20**, Unit 20.1.
217. PALLA B, SU A, BINDER S, DRY S. SOX10 expression distinguishes desmoplastic melanoma from its histologic mimics. *Am J Dermatopathol.* 2013, **35**, 576-581.

218. PARATORE C, GOERICH DE, SUTER U, WEGNER M, SOMMER L. Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Dev Camb Engl*. 2001, **128**, 3949-3961.
219. PATNAIK AK, ERLANDSON RA, LIEBERMAN PH. Canine malignant melanotic schwannomas: a light and electron microscopic study of two cases. *Vet Pathol*. 1984, **21**, 483-488.
220. PAUS R, COTSARELIS G. The biology of hair follicles. *N Engl J Med*. 1999, **341**, 491-497.
221. PAVAN WJ, TILGHMAN SM. Piebald lethal (sl) acts early to disrupt the development of neural crest-derived melanocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994, **91**, 7159-7163.
222. PENNEYS NS, MOGOLLON R, KOWALCZYK A, NADJI M, ADACHI K. A survey of cutaneous neural lesions for the presence of myelin basic protein. An immunohistochemical study. *Arch Dermatol*. 1984, **120**, 210-213.
223. PERCY DH, BARTHOLD SW. *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits, Third Edition*, 3 edition. ed. 2007, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 356 p.
224. PETERS A, PALAY SL, WEBSTER H deF. *The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells*. 1976, Saunders, 440 p.
225. PEVNY LH, LOVELL-BADGE R. Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev*. 1997, **7**, 338-344.
226. PINGAULT V, BODEREAU V, BARAL V, MARCOS S, WATANABE Y, CHAOUI A, et al. Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness. *Am J Hum Genet*. 2013, **92**, 707-724.
227. PINGAULT V, BONDURAND N, KUHLEBRODT K, GOERICH DE, PRÉHU MO, PULITI A, et al. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet*. 1998, **18**, 171-173.
228. PINGAULT V, ENTE D, DASTOT-LE MOAL F, GOOSSENS M, MARLIN S, BONDURAND N. Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum Mutat*. 2010, **31**, 391-406.
229. PLANQUE N, TURQUE N, OPDECAMP K, BAILLY M, MARTIN P, SAULE S. Expression of the microphthalmia-associated basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factor Mi in avian neuroretina cells induces a pigmented phenotype. *Cell Growth Differ Mol Biol J Am Assoc Cancer Res*. 1999, **10**, 525-536.
230. POHL BS, KNÖCHEL W. Overexpression of the transcriptional repressor FoxD3 prevents neural crest formation in *Xenopus* embryos. *Mech Dev*. 2001, **103**, 93-106.
231. POTTERF SB, MOLLAAGHABABA R, HOU L, SOUTHARD-SMITH EM, HORNYAK TJ, ARNHEITER H, et al. Analysis of SOX10 function in neural crest-derived melanocyte development: SOX10-dependent transcriptional control of dopachrome tautomerase. *Dev Biol*. 2001, **237**, 245-257.
232. RADTKE F, WILSON A, MACDONALD HR. Notch signaling in hematopoiesis and lymphopoiesis: lessons from *Drosophila*. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 2005, **27**, 1117-1128.
233. RAIMONDI S, SERA F, GANDINI S, IODICE S, CAINI S, MAISONNEUVE P, et al. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2008, **122**, 2753-2760.
234. RAPOSO G, MARKS MS. Melanosomes - dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007, **8**, 786-797.
235. REAL C, GLAVIEUX-PARDANAUD C, LE DOUARIN NM, DUPIN E. Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potential. *Dev Biol*. 2006, **300**, 656-669.

236. REAL C, GLAVIEUX-PARDANAUD C, VAIGOT P, LE-DOUARIN N, DUPIN E. The instability of the neural crest phenotypes: Schwann cells can differentiate into myofibroblasts. *Int J Dev Biol.* 2005, **49**, 151-159.
237. RECIO JA, NOONAN FP, TAKAYAMA H, ANVER MR, DURAY P, RUSH WL, et al. Ink4a/arf deficiency promotes ultraviolet radiation-induced melanomagenesis. *Cancer Res.* 2002, **62**, 6724-6730.
238. RESTA N, GIORDA R, BAGNULO R, BERI S, DELLA MINA E, STELLA A, et al. Breakpoint determination of 15 large deletions in Peutz-Jeghers subjects. *Hum Genet.* 2010, **128**, 373-382.
239. RICCARDI VM, LEWIS RA. Penetrance of von Recklinghausen neurofibromatosis: a distinction between predecessors and descendants. *Am J Hum Genet.* 1988, **42**, 284-289.
240. RICHARDSON MK, SIEBER-BLUM M. Pluripotent neural crest cells in the developing skin of the quail embryo. *Dev Biol.* 1993, **157**, 348-358.
241. RICHETTA A, GIUSTINI S, RECUPERO SM, PEZZA M, CARLOMAGNO V, AMORUSO G, et al. Lisch nodules of the iris in neurofibromatosis type 1. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2004, **18**, 342-344.
242. RIZVI TA, HUANG Y, SIDANI A, ATIT R, LARGAESPADA DA, BOISSY RE, et al. A novel cytokine pathway suppresses glial cell melanogenesis after injury to adult nerve. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2002, **22**, 9831-9840.
243. ROGERS GE. Hair follicle differentiation and regulation. *Int J Dev Biol.* 2004, **48**, 163-170.
244. ROH E, YUN C-Y, YOUNG YUN J, PARK D, DOO KIM N, YEON HWANG B, et al. cAMP-binding site of PKA as a molecular target of bisabolangelone against melanocyte-specific hyperpigmented disorder. *J Invest Dermatol.* 2013, **133**, 1072-1079.
245. ROSCOE B. JACKSON MEMORIAL LABORATORY. *Handbook on genetically standardized Jax mice.* 1962, Jackson Laboratory,, Bar Harbor, Me.:
246. SÁNCHEZ-MEJÍAS A, WATANABE Y, M FERNÁNDEZ R, LÓPEZ-ALONSO M, ANTIÑOLO G, BONDURAND N, et al. Involvement of SOX10 in the pathogenesis of Hirschsprung disease: report of a truncating mutation in an isolated patient. *J Mol Med Berl Ger.* 2010, **88**, 507-514.
247. SANTAGATI F, RIJLI FM. Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nat Rev Neurosci.* 2003, **4**, 806-818.
248. SAUKA-SPENGLER T, BRONNER-FRASER M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008, **9**, 557-568.
249. SCHOLL FA, KAMARASHEV J, MURMANN OV, GEERTSEN R, DUMMER R, SCHÄFER BW. PAX3 is expressed in human melanomas and contributes to tumor cell survival. *Cancer Res.* 2001, **61**, 823-826.
250. SCHOUWEY K, BEERMANN F. The Notch pathway: hair graying and pigment cell homeostasis. *Histol Histopathol.* 2008, **23**, 609-619.
251. SCHOUWEY K, DELMAS V, LARUE L, ZIMMER-STROBL U, STROBL LJ, RADTKE F, et al. Notch1 and Notch2 receptors influence progressive hair graying in a dose-dependent manner. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* 2007, **236**, 282-289.
252. SELLECK MA, BRONNER-FRASER M. Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Dev Camb Engl.* 1995, **121**, 525-538.
253. SERBEDZIJA GN, BRONNER-FRASER M, FRASER SE. Developmental potential of trunk neural crest cells in the mouse. *Dev Camb Engl.* 1994, **120**, 1709-1718.

254. SERBEDZIJA GN, FRASER SE, BRONNER-FRASER M. Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labelling. *Dev Camb Engl.* 1990, **108**, 605-612.
255. SERRANO M, LEE H, CHIN L, CORDON-CARDO C, BEACH D, DEPINHO RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell.* 1996, **85**, 27-37.
256. SHERMAN L, STOCKER KM, MORRISON R, CIMENT G. Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts intracellularly to cause the transdifferentiation of avian neural crest-derived Schwann cell precursors into melanocytes. *Dev Camb Engl.* 1993, **118**, 1313-1326.
257. SHIBAHARA S, TOMITA Y, SAKAKURA T, NAGER C, CHAUDHURI B, MÜLLER R. Cloning and expression of cDNA encoding mouse tyrosinase. *Nucleic Acids Res.* 1986, **14**, 2413-2427.
258. SHIN MK, LEVORSE JM, INGRAM RS, TILGHMAN SM. The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature.* 1999, **402**, 496-501.
259. SIEBER-BLUM M, COHEN AM. Clonal analysis of quail neural crest cells: they are pluripotent and differentiate in vitro in the absence of noncrest cells. *Dev Biol.* 1980, **80**, 96-106.
260. SILVER A, CHASE H, POTTEN C. The effect of X-irradiation on the dormant (amelanotic) melanocytes of the hair germ. *Pigment Cell.* 1976, 299-310.
261. SILVERS W. *The coat color of mice, a model for mammalian gene action and interaction*, Springer-Verlag. ed. 1979, New-York.
262. SIMÕES-COSTA M, BRONNER ME. Insights into neural crest development and evolution from genomic analysis. *Genome Res.* 2013, **23**, 1069-1080.
263. SLOMINSKI A, PAUS R, PLONKA P, CHAKRABORTY A, MAURER M, PRUSKI D, et al. Melanogenesis during the anagen-catagen-telogen transformation of the murine hair cycle. *J Invest Dermatol.* 1994, **102**, 862-869.
264. SLOMINSKI A, TOBIN DJ, SHIBAHARA S, WORTSMAN J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev.* 2004, **84**, 1155-1228.
265. SMITH SH, GOLDSCHMIDT MH, MCMANUS PM. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol Online.* 2002, **39**, 651-678.
266. SMOLLER BR. Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2006, **19 Suppl 2**, S34-40.
267. SOMMER L. Generation of melanocytes from neural crest cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011, **24**, 411-421.
268. SONNENBERG-RIETHMACHER E, MIEHE M, STOLT CC, GOERICH DE, WEGNER M, RIETHMACHER D. Development and degeneration of dorsal root ganglia in the absence of the HMG-domain transcription factor Sox10. *Mech Dev.* 2001, **109**, 253-265.
269. SORIANO P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet.* 1999, **21**, 70-71.
270. SOUTHARD-SMITH EM, ANGRIST M, ELLISON JS, AGARWALA R, BAXEVANIS AD, CHAKRAVARTI A, et al. The Sox10(Dom) mouse: modeling the genetic variation of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Genome Res.* 1999, **9**, 215-225.
271. SOUTHARD-SMITH EM, KOS L, PAVAN WJ. Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet.* 1998, **18**, 60-64.
272. STEEL KP, DAVIDSON DR, JACKSON IJ. TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. *Dev Camb Engl.* 1992, **115**, 1111-1119.
273. STENN KS, PAUS R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev.* 2001, **81**, 449-494.

274. SU WP. Malignant melanoma: basic approach to clinicopathologic correlation. *Mayo Clin Proc.* 1997, **72**, 267-272.
275. SUGIYAMA S. Mode of redifferentiation and melanogenesis of melanocytes in mouse hair follicles. An ultrastructural and cytochemical study. *J Ultrastruct Res.* 1979, **67**, 40-54.
276. SULAIMON SS, KITCHELL BE. The biology of melanocytes. *Vet Dermatol.* 2003, **14**, 57-65.
277. SUNDBERG JP, PETERS EMJ, PAUS R. Analysis of hair follicles in mutant laboratory mice. *J Invest Dermatol Symp Proc Soc Invest Dermatol Inc Eur Soc Dermatol Res.* 2005, **10**, 264-270.
278. SVIDERSKAYA EV, WAKELING WF, BENNETT DC. A cloned, immortal line of murine melanoblasts inducible to differentiate to melanocytes. *Dev Camb Engl.* 1995, **121**, 1547-1557.
279. TACHIBANA M, KOBAYASHI Y, MATSUSHIMA Y. Mouse models for four types of Waardenburg syndrome. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc.* 2003, **16**, 448-454.
280. TACHIBANA M, TAKEDA K, NOBUKUNI Y, URABE K, LONG JE, MEYERS KA, et al. Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics. *Nat Genet.* 1996, **14**, 50-54.
281. TAKANO A, ZOCHI R, HIBI M, TERASHIMA T, KATSUYAMA Y. Expression of strawberry notch family genes during zebrafish embryogenesis. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* 2010, **239**, 1789-1796.
282. TANEYHILL LA, BRONNER-FRASER M. Dynamic alterations in gene expression after Wnt-mediated induction of avian neural crest. *Mol Biol Cell.* 2005, **16**, 5283-5293.
283. TASSABEHJI M, NEWTON VE, READ AP. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat Genet.* 1994, **8**, 251-255.
284. TENG L, MUNDELL NA, FRIST AY, WANG Q, LABOSKY PA. Requirement for Foxd3 in the maintenance of neural crest progenitors. *Dev Camb Engl.* 2008, **135**, 1615-1624.
285. THEOS A, KORF BR, AMERICAN COLLEGE OF PHYSICIANS, AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY. Pathophysiology of neurofibromatosis type 1. *Ann Intern Med.* 2006, **144**, 842-849.
286. THOMAS AJ, ERICKSON CA. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008, **21**, 598-610.
287. THOMAS AJ, ERICKSON CA. FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. *Dev Camb Engl.* 2009, **136**, 1849-1858.
288. THOMPSON JA, ZIMAN M. Pax genes during neural development and their potential role in neuroregeneration. *Prog Neurobiol.* 2011, **95**, 334-351.
289. TOBIN DJ, HAGEN E, BOTCHKAREV VA, PAUS R. Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)? *J Invest Dermatol.* 1998, **111**, 941-947.
290. TSAO H, CHIN L, GARRAWAY LA, FISHER DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* 2012, **26**, 1131-1155.
291. TSUDA L, NAGARAJ R, ZIPURSKY SL, BANERJEE U. An EGFR/Ebi/Sno pathway promotes delta expression by inactivating Su(H)/SMRTER repression during inductive notch signaling. *Cell.* 2002, **110**, 625-637.
292. TUMBAR T, GUASCH G, GRECO V, BLANPAIN C, LOWRY WE, RENDL M, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science.* 2004, **303**, 359-363.
293. VALLAT-DECOUVELAERE AV, WASSEF M, LOT G, CATALA M, MOUSSALAM M, CARUEL N, et al. Spinal melanotic schwannoma: a tumour with poor prognosis. *Histopathology.* 1999, **35**, 558-566.

294. VAN RAAMSDONK CD, BEZROOKOVE V, GREEN G, BAUER J, GAUGLER L, O'BRIEN JM, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*. 2009, **457**, 599-602.
295. VAN RAAMSDONK CD, DEO M. Links between Schwann cells and melanocytes in development and disease. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013, **26**, 634-645.
296. VEUGELERS M, WILKES D, BURTON K, MCDERMOTT DA, SONG Y, GOLDSTEIN MM, et al. Comparative PRKAR1A genotype-phenotype analyses in humans with Carney complex and prkar1a haploinsufficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, **101**, 14222-14227.
297. VINCENT-NAULLEAU S, LE CHALONY C, LEPLAT J-J, BOUET S, BAILLY C, SPATZ A, et al. Clinical and histopathological characterization of cutaneous melanomas in the melanoblastoma-bearing Libechev minipig model. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc*. 2004, **17**, 24-35.
298. VOGEL KS, KLESSE LJ, VELASCO-MIGUEL S, MEYERS K, RUSHING EJ, PARADA LF. Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1. *Science*. 1999, **286**, 2176-2179.
299. WALKER GJ, SOYER HP, TERZIAN T, BOX NF. Modelling melanoma in mice. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011, **24**, 1158-1176.
300. WALLACE MR, MARCHUK DA, ANDERSEN LB, LETCHER R, ODEH HM, SAULINO AM, et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science*. 1990, **249**, 181-186.
301. WALTER RB, KAZIANIS S. Xiphophorus interspecies hybrids as genetic models of induced neoplasia. *ILAR J Natl Res Counc Inst Lab Anim Resour*. 2001, **42**, 299-321.
302. WATANABE A, TAKEDA K, PLOPLIS B, TACHIBANA M. Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. *Nat Genet*. 1998, **18**, 283-286.
303. WATT FM, LO CELSO C, SILVA-VARGAS V. Epidermal stem cells: an update. *Curr Opin Genet Dev*. 2006, **16**, 518-524.
304. WEGNER M. Secrets to a healthy Sox life: lessons for melanocytes. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc*. 2005, **18**, 74-85.
305. WEISS SW, GOLDBLUM JR, ENZINGER FM. Benign tumors of peripheral nerves, in: *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*. 2014,. Mosby Elsevier, Philadelphia, PA, p. 784-854.
306. WESTON JA. Sequential segregation and fate of developmentally restricted intermediate cell populations in the neural crest lineage. *Curr Top Dev Biol*. 1991, **25**, 133-153.
307. WILKES D, MCDERMOTT DA, BASSON CT. Clinical phenotypes and molecular genetic mechanisms of Carney complex. *Lancet Oncol*. 2005, **6**, 501-508.
308. WINDER AJ, WITTBGER A, ROSENGREN E, RORSMAN H. The mouse brown (b) locus protein has dopachrome tautomerase activity and is located in lysosomes in transfected fibroblasts. *J Cell Sci*. 1993, **106 (Pt 1)**, 153-166.
309. WONG CE, PARATORE C, DOURS-ZIMMERMANN MT, ROCHAT A, PIETRI T, SUTER U, et al. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol*. 2006, **175**, 1005-1015.
310. WOODHOO A, SOMMER L. Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia*. 2008, **56**, 1481-1490.
311. WRIGHT EM, SNOPEK B, KOOPMAN P. Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res*. 1993, **21**, 744.

312. WU J, WILLIAMS JP, RIZVI TA, KORDICH JJ, WITTE D, MEIJER D, et al. Plexiform and dermal neurofibromas and pigmentation are caused by Nf1 loss in desert hedgehog-expressing cells. *Cancer Cell*. 2008, **13**, 105-116.
313. YAJIMA I, SATO S, KIMURA T, YASUMOTO K, SHIBAHARA S, GODING CR, et al. An L1 element intronic insertion in the black-eyed white (Mitf^{mi-bw}) gene: the loss of a single Mitf isoform responsible for the pigmentary defect and inner ear deafness. *Hum Mol Genet*. 1999, **8**, 1431-1441.
314. YAMAGATA M, NODA M. The winged-helix transcription factor CWH-3 is expressed in developing neural crest cells. *Neurosci Lett*. 1998, **249**, 33-36.
315. YOSHIDA H, KUNISADA T, KUSAKABE M, NISHIKAWA S, NISHIKAWA SI. Distinct stages of melanocyte differentiation revealed by analysis of nonuniform pigmentation patterns. *Dev Camb Engl*. 1996, **122**, 1207-1214.
316. ZHU Y, GHOSH P, CHARNAY P, BURNS DK, PARADA LF. Neurofibromas in NF1: Schwann Cell Origin and Role of Tumor Environment. *Science*. 2002, **296**, 920-922.
317. ZÖLLER ME, REMBECK B, ODÉN A, SAMUELSSON M, ANGERVALL L. Malignant and benign tumors in patients with neurofibromatosis type 1 in a defined Swedish population. *Cancer*. 1997, **79**, 2125-2131.